

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

THÈSE PRÉSENTÉE À  
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE  
(ONCOLOGIE)

PAR  
MARIE-CLAUDE DÉRY

CARACTÉRISATION D'UNE NOUVELLE LIGNÉE DU CANCER ENDOMÉTRIAL  
ET L'IMPLICATION DE L'OCYTOCINE DANS L'INVASION  
DES CANCERS ENDOMÉTRIAUX

MAI 2013

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES

DOCTORAT EN BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE (PH.D.)  
(ONCOLOGIE)

Programme offert par l'Université du Québec à Trois-Rivières

CARACTÉRISATION D'UNE NOUVELLE LIGNÉE DU CANCER ENDOMÉTRIAL ET  
L'IMPLICATION DE L'OCYTOCINE DANS L'INVASION  
DES CANCERS ENDOMÉTRIAUX

PAR

MARIE-CLAUDE DÉRY

Eric Asselin

Directeur de recherche

Université du Québec à Trois-Rivières

Monique Cadrin

Présidente du jury

Université du Québec à Trois-Rivières

Carlos Reyes-Moreno

Évaluateur

Université du Québec à Trois-Rivières

Michel A. Fortier

Évaluateur externe

Université Laval

Thèse soutenue le 19 avril 2013

*À Philippe-Antoine.*

## REMERCIEMENTS

Pour commencer, j'aimerais remercier mon directeur de thèse Dr Éric Asselin pour m'avoir offert l'opportunité d'entreprendre ce long voyage qu'a été mon doctorat. Merci pour ta patience, ça n'a pas toujours été facile ... J'ai toujours eu une profonde admiration pour le travail que tu accomplis. Avec toute la passion et les efforts que tu mets dans ce que tu entreprends, ce n'est pas étonnant que tu réussisses si bien. J'ai eu la chance de faire partie d'une excellente équipe. Merci pour les belles opportunités de congrès, les partys et pour les bons souvenirs et anecdotes qui y sont rattachés.

Je veux aussi remercier Sophie et Valérie qui s'occupent si bien du labo et de ses occupants. Merci pour vos Ô combien précieux conseils et aides techniques. Merci d'avoir ensoleillé ma vie de labo et de l'avoir rendue agréable. Vous me manquez très souvent. Une pensée spéciale et mes remerciements aux nombreux collègues que j'ai vu arriver puis partir du labo.

En terminant, je remercie du fond du cœur ma famille et mes amis, mais plus particulièrement Pierre et ma mère, à qui je dédie également cette thèse. Vos encouragements, votre aide et votre confiance m'ont grandement soutenue tout au long de mes études graduées. Aussi, finir la rédaction du doc dans les circonstances, c'était vraiment très difficile. Sans vous, je n'y serais jamais arrivée. Maintenant, l'heure est venue pour moi de profiter de la vie avec ma petite famille.

## RÉSUMÉ

Au Canada ainsi que dans la plupart des pays industrialisés le cancer est la première cause de mortalité, devançant maintenant les maladies cardiovasculaires. Suivant le cancer du sein, du poumon et du côlon, le cancer de l'endomètre occupe la 4<sup>e</sup> place des cancers les plus fréquemment diagnostiqués chez la femme. Bien que le cancer de l'endomètre soit hautement curable lorsqu'il est détecté précocement, les femmes atteintes d'un carcinome endométrial métastasé ont un taux de survie de moins de 20 %. Ainsi, la présence de métastases est la principale cause du décès des patientes atteintes du cancer de l'endomètre. Très peu de modèles expérimentaux sont disponibles jusqu'à maintenant pour la caractérisation des facteurs impliqués dans le phénotype métastatique du carcinome endométrial. C'est donc dire que très peu de lignées du cancer endométrial dérivent directement de métastases. Nous avons donc procédé à la caractérisation d'une nouvelle lignée du carcinome endométrial : EN-1078D. Cette lignée a été dérivée à partir d'une métastase ovarienne et est issue d'un cancer de stade avancé et pauvrement différencié. Nous avons procédé à des analyses cytologiques, cytogénétiques et moléculaires ainsi qu'à des xénogreffes et des tests de sensibilité aux principaux agents chimiothérapeutiques utilisés en traitement du cancer endométrial. L'ensemble de nos résultats suggèrent que la nouvelle lignée EN-1078D sera un excellent modèle afin d'étudier les propriétés métastatiques des cellules du cancer endométrial ainsi que leur régulation par les hormones sexuelles stéroïdiennes. Alors que l'implication des oestrogènes et de la progestérone dans l'initiation et la régulation du cancer endométrial ne fait certainement plus aucun doute, nous avons mis en évidence un rôle inattendu pour une autre hormone : l'ocytocine. Cette petite hormone connue classiquement pour son rôle dans la parturition, l'allaitement et le développement du comportement maternel, a démontré sa capacité d'induire l'invasion des cellules du carcinome endométrial. Nous avons démontré que l'ocytocine induit l'invasion via la production de la PGE<sub>2</sub> et de son récepteur EP1 et que cette réponse est dépendante de l'activation de la voie de PI 3-K/Akt. Plusieurs acteurs sont impliqués dans le processus, il s'agit de COX-1, COX-2, XIAP, MMP-2, MMP-14, PKC et même la voie de ERK1/2. Avec la présence confirmée du récepteur OTR dans tous les grades (I, II et III) du cancer de l'endomètre, nos résultats suggèrent que le système ocytocine/OTR devrait être considéré comme un important facteur impliqué dans la progression du cancer endométrial.

**Mots-clés :** caractérisation, carcinome endométrial, EN-1078D, ocytocine, OTR, PGE<sub>2</sub>, PI 3-K/Akt, COX-1, COX-2, XIAP, MMP-2, MMP-14, invasion, métastase

## TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>V</b>
<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XIV</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS .....</b>	<b>XV</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
1.1 La carcinogenèse ou le développement d'un cancer .....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Les proto-oncogènes.....	2
1.1.2.1 HER-2/neu.....	3
1.1.2.2 K-Ras.....	4
1.1.3 Les supresseurs de tumeurs .....	5
1.2 L'apoptose et la survie cellulaire.....	6
1.2.1 Généralités.....	6
1.2.2 Le cycle de division cellulaire.....	6
1.2.3 Évènements apoptotiques .....	8
1.2.3.1 La famille de Bcl-2.....	9
1.2.3.2 La famille des Caspases .....	11
1.2.4 La voie apoptotique intrinsèque ou mitochondriale .....	13
1.2.5 La voie apoptotique extrinsèque.....	14
1.3 La voie de signalisation de PI 3-K/AKT .....	15
1.3.1 Généralités.....	15
1.3.2 Phosphatidylinositol 3'OH kinase (PI 3-K) .....	16
1.3.2.1 La classe I de PI 3-K .....	17
1.3.2.2 Les classes II et III de PI 3-K.....	18
1.3.2.3 L'inhibition de PI 3-K.....	19
1.3.3 Akt/PKB/Rac et ses isoformes .....	19
1.3.3.1 Les isoformes d'Akt .....	20

1.3.3.2	L'activation d'Akt .....	22
1.3.3.3	Les effecteurs d'Akt .....	23
1.3.4	PTEN/MMAC/TEP1 .....	26
1.3.4.1	Structure de la protéine PTEN.....	26
1.3.4.2	Les fonctions biologiques de PTEN.....	28
1.3.5	La famille des Inhibiteurs d'Apoptose (IAPs).....	29
1.3.5.1	Structure des protéins IAPs .....	30
1.3.5.2	XIAP .....	31
1.3.5.3	cIAP-1 et cIAP-2 .....	32
1.3.5.4	Les antagonistes des IAPs .....	33
1.4	Invasion cellulaire et métastase.....	34
1.4.1	Généralités .....	34
1.4.2	Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) .....	36
1.4.2.1	Généralités.....	36
1.4.2.2	Structure et activation des MMPs .....	37
1.4.2.3	Les MMP-2, MMP-9 et la MMP-14 .....	38
1.4.2.4	Les MMPs et le cancer .....	40
1.4.3	Les inhibiteurs des MMPs .....	41
1.5	Les prostaglandines et les cyclooxygénases.....	42
1.5.1	Généralités .....	42
1.5.2	Les prostaglandines (PGs).....	42
1.5.3	Les cyclooxygénases COX-1 et COX-2.....	44
1.5.4	Les récepteurs des prostaglandines .....	45
1.5.5	La relation entre COX-2, les prostaglandines et le cancer .....	45
1.6	L'ocytocine.....	47
1.6.1	Structure et fonction de l'ocytocine .....	47
1.6.2	Le récepteur de l'ocytocine (OTR).....	49
1.6.3	La voie conventionnelle de l'activation du récepteur de l'ocytocine .....	51
1.6.4	La voie non-conventionnelle de l'activation du récepteur de l'ocytocine .....	52
1.6.5	Une troisième voie d'activation du récepteur de l'ocytocine? .....	52
1.7	Le cancer endométrial .....	53
1.7.1	L'utérus, organe gestationnel .....	53



1.7.2	Le cycle menstruel.....	54
1.7.3	Le cancer de l'utérus : type I et II.....	55
1.7.4	Manifestations cliniques.....	56
1.7.5	Fréquence du cancer de l'endomètre.....	57
1.7.6	Stadification et grades.....	57
1.7.7	Traitements.....	58
1.8	Les objectifs.....	60
1.8.1	Caractérisation d'une nouvelle lignée du cancer endométrial.....	60
1.8.2	L'ocytocine et l'invasion des cellules du carcinome endométrial.....	60

## CHAPITRE II

### **CHARACTERIZATION OF EN-1078D, A POORLY DIFFERENTIATED HUMAN ENDOMETRIAL CARCINOMA CELL LINE: A NOVEL TOOL TO STUDY ENDOMETRIAL INVASION *IN VITRO*..... 62**

2.1	Contribution des auteurs.....	62
2.2	Résumé.....	62
2.3	Article scientifique.....	64
2.3.1	Abstract.....	64
2.3.2	Introduction.....	65
2.3.3	Materials and methods.....	67
2.3.4	Results.....	73
2.3.5	Discussion.....	77
2.3.6	Acknowledgments.....	80
2.3.7	Reference List.....	81
2.3.8	Figure legends.....	87
2.3.9	Tables.....	89
2.3.10	Figures.....	90

## CHAPITRE III

### **OXYTOCIN INCREASES INVASIVE PROPERTIES OF ENDOMETRIAL CANCER CELLS THROUGH PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE/AKT-DEPENDENT UP-REGULATION OF CYCLOOXYGENASE-1, -2 AND X-LINKED INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEIN..... 98**

3.1	Contribution des auteurs.....	98
3.2	Résumé.....	98

3.3	Article scientifique .....	100
3.3.1	Abstract.....	100
3.3.2	Introduction .....	101
3.3.3	Materials and Methods .....	102
3.3.4	Results .....	107
3.3.5	Discussion.....	111
3.3.6	Conclusion.....	114
3.3.7	Reference List.....	115
3.3.8	Figure legends .....	120
3.3.9	Tables .....	124
3.3.10	Figures .....	125

#### CHAPITRE IV

#### **L'IMPLICATION DES VOIES PI 3-K/AKT, ERK1/2 ET PKC DANS L'INVASION TUMORALE INDUITE EN RÉPONSE À L'OCYTOCINE - RÉSULTATS NON PUBLIÉS - ..... 132**

4.1	Introduction .....	132
4.2	Matériel et Méthodes.....	132
4.2.1	Immunobuvardage de type Western Blot .....	132
4.2.2	Test de prolifération au MTT .....	133
4.2.3	Test d'invasion avec Matrigel .....	134
4.2.4	Marquage nucléaire au Hoescht .....	134
4.3	Résultats .....	135
4.3.1	Présence du récepteur à l'ocytocine dans différentes lignées du cancer endométrial.....	135
4.3.2	L'effet de l'ocytocine sur la prolifération cellulaire dans différentes lignées du cancer endométrial .....	136
4.3.3	L'ocytocine augmente l'invasivité cellulaire via l'activation de la voie de PI 3-K.....	137
4.3.4	L'ocytocine régule l'expression de la famille des Bcl-2 dans les cellules du carcinome endométrial .....	139
4.3.5	L'ocytocine induit l'activation de la caspase-3 chez les cellules du carcinome endométrial .....	139
4.3.6	L'expression des IAPs est augmentée en réponse à l'ocytocine .....	142
4.3.7	PKC est impliqué dans l'augmentation de l'invasivité en réponse à l'ocytocine chez les cellules du carcinome endométrial .....	143



## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
Figure 1.1 : La transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. ..	2
Figure 1.2 : Le cycle cellulaire. ....	7
Figure 1.3 : Voies de signalisation menant à l'apoptose. ....	10
Figure 1.4 : Structure et activation des caspases. ....	12
Figure 1.5 : Schématisation de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt. ....	16
Figure 1.6 : L'activation d'Akt par la PDK-1 et mTORC2. ....	23
Figure 1.7 : Schématisation de la structure de PTEN. ....	27
Figure 1.8 : Les membres de la famille des IAPs. ....	31
Figure 1.9 : Les 5 étapes de la cascade métastatique. ....	34
Figure 1.10 : Structure des MMPs. ....	39
Figure 1.11 : Schématisation de la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines par les cyclooxygénases. ....	43
Figure 1.12 : Le rôle de COX-2 dans la progression du cancer. ....	47
Figure 1.13 : L'effet de l'ocytocine sur différents systèmes. ....	48
Figure 1.14 : Les sites de production d'ocytocine et les organes cibles. ....	50
Figure 1.15 : Modèle proposé pour la production des prostaglandines en réponse à l'ocytocine. ....	53

Figure 1.16 :	Cycle menstruel de la femme.....	55
Figure 4.1 :	Présence du récepteur OTR dans différentes lignées du cancer endométrial humain.....	135
Figure 4.2 :	L'ocytocine n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules du cancer endométrial.....	136
Figure 4.3 :	L'invasivité des cellules de Hec-1-A en réponse à l'ocytocine est augmentée via la voie de PI 3-K/Akt. ....	138
Figure 4.4 :	Les effets de l'ocytocine sur la voie de Bcl-2 chez les cellules du carcinome endométrial Hec-1-A. ....	140
Figure 4.5 :	L'ocytocine induit l'activation de la caspase-3 chez les cellules du carcinome endométrial Hec-1-A sans atteindre l'apoptose. ....	141
Figure 4.6 :	L'ocytocine augmente l'expression des IAPs chez les cellules Hec-1-A. ....	142
Figure 4.7 :	L'invasivité des cellules de Hec-1-A en réponse à l'ocytocine est dépendante de l'activation de PKC. ....	143

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau</b>	<b>Page</b>
Tableau 1.1 Les protéines anti- ou pro-apoptotiques.....	11

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

%	pourcentage
°C	degré celsius
µg	microgramme
µL	microlitre
µM	micromolaire
4E-BP1 4E	(eIF4E)-binding protein 1
ADAMTS1	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-1
ADN ou DNA	Acide désoxyribonucléique
AGC kinases	Adenine-guanine-cytosine kinases
AIF	Apoptosis inducing factor
Akt	Activated by kinase tyrosine
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
ATP	adénosine triphosphate
Bad	Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter
Bak	Bcl-2-antagonist killer
Bax	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B cell lymphomas-2
Bcl-W	B-cell leukemia W
Bcl-XL	B-cell leukemia XL
BCR	Breakpoint Cluster Region
BH	B cell lymphomas-2 homolog domain
BH3	Bcl-2 homology domain 3
Bid	BH3 domain-only death agonist protein
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bim	Bcl-2 interacting protein
BIR	Baculoviral IAP repeat
Bok	Bcl2 related ovarian killer
Ca <sup>2+</sup>	Calcium

CAM	Cell adhesion molecule
cAMP	AMP cyclique
CARD	Caspase recruitment domain
Caspases	Cysteine aspartic acid-specific proteases
Cdc42	Cell division cycle 42
CDKs	Protéines kinases cyclines-dépendantes
cDNA	ADN complémentaire
CED	Caenorhabditis Elegans Death gene
CENP-C	Protéine centromérique C
cIAP-1	cellular Inhibitor of apoptosis protein 1
cIAP-2	cellular Inhibitor of apoptosis protein 2
CK2	Casein kinase II
cm <sup>2</sup>	centimètre carré
c-Myc	Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
COX-1	Cyclooxygénase-1
COX-2	Cyclooxygénase-2
COXs	Cyclooxygénases
DAG	1,2 diacylglycérol
DD	Death domain
DED	Death effector domain
DISC	Death-inducing signaling complex
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
DR4/DR5	Death receptor 4 and 5
dT	deoxythimidine
DTT	dithiothreitol
E <sub>2</sub>	17β Oestradiol
E3	Ubiquitin protein ligase
ECM	Extracellular matrix
EGF	Epidermal Growth Factor



EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
ErbB	Avian erythroblastosis oncogene B
ERK1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1 and 2
ER $\alpha$	Récepteur oestrogénique alpha
Er $\beta$	Récepteur oestrogénique beta
FADD	Fas-associating protein with death domain
FAK	Focal adhesion kinase
Fas	TNF superfamily receptor 6
FasL	Fas ligand
FBS	sérum fétal bovin
Fig.	figure
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie d'Obstétrique
FISH	hybridation fluorescente in situ
FOXO	Forkhead box class O
g	gramme
G0	Phase quiescente
G1	Gap 1
G2	Gap 2
GDP	guanine diphosphate
GPCR	Récepteurs couplés à la protéine G
GSK-3	Glycogen synthase kinase 3
GSPT1/eRF3	G1 to S phase transition protein 1
GTP	guanine triphosphate
HER-2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
Hrs	heures
IAPs	Inhibitor of apoptosis proteins
IBM	IAP-binding motif
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice 50 %
ICE	Interleukin-1 $\beta$ Converting Enzyme
IGF-1	Insulin-like growth factor 1

IKK $\alpha$	Inhibiteurs de la kappa B-kinase $\alpha$
IL-2	Interleukine 2
ILK	Integrin-linked kinase
ILP2	IAP-like protein 2
IRS	Insulin receptors
iSH2	Inter-domaine SH2
I $\kappa$ B	Inhibitor of NF- $\kappa$ B
kb	kilobases
kDa	kiloDaltons
kg	kilogramme
K-Ras	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L	Litre
LRP 1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1
LY294002	2-(4-morpholinyl)chromone
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MAPKAP kinase 2	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
MDM2	Murine double minute 2
MEK	MAP/ERK kinase
mg	milligramme
MgCl <sub>2</sub>	dichlorure de magnésium
min.	minute
mL	millilitre
mLST8	Mammalian LST8/G-protein beta-subunit like protein
MMAC	Mutated in multiple advanced cancers
MMLV-RT	Muloney murine leukemia virus reverse transcriptase
MMP-2	Gélatinase A
MMP-9	Gélatinase B
MMPs	Métalloprotéinases matricielles
mRNA ou ARNm	ARN messenger
MT-MMPs	Membrane anchored MMPs

mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex-1
mTORC2	Mammalian target of rapamycin complex 2
MTT	3-(4,5-dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	chlorure de sodium
NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonate de sodium
NAIP	Neuronal apoptosis inhibitory protein
NEDD4-1	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4
NF-κB	Nuclear factor κ B
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
OD	densité optique
OT	Ocytocine
OTR	Récepteur à l'ocytocine
P <sub>4</sub>	Progestérone
p70S6K	p70 S6 kinase ribosomale
PAGE	gel de polyacrylamide pour électrophorèse
PARP	Poly(ADP-ribose)polymerase
pb ou bp	paires de bases
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDK-1	3-phosphoinositides-dependent-kinase-1
PDK-2	3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2
PDZ	site de liaison PSD95/Dlg/ZO1
PEST domain	proline, glutamic acid, serine domain
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandine F <sub>2</sub> alpha
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandine H <sub>2</sub>
PGs	Prostaglandines
PGT	Transporteur de prostaglandines
PH	Pleckstrin Homology
Phase M	Phase mitotique

Phase S	Phase de synthèse
PHLPP	PH domain leucine-rich repeat phosphatase
PI 3-K	Phosphatidylinositol 3'OH kinase
Pik3r1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1
Pik3r2	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2
Pik3r3	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKB	Protéine kinase B
PKC	Protéine kinase C
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C phosphoinositol spécifique
PP2	Protein phosphatase 2
PRAS40	Proline rich Akt substrate of 40 kDa
PR-B	Récepteur progestéronique B
PtdIns (4,5)P <sub>2</sub> ou PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PtdIns 3-P ou PI 3-P	Phosphatidylinositol 3-phosphate
PtdIns 4-P ou PIP	Phosphatidylinositol 4-phosphate
PtdIns ou PI	Phosphatidylinositols
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
PTPs	Superfamille des protéines tyrosines phosphatases
Puma	p53 up-regulated modulator of apoptosis
Rac	Related to A and C protein kinase
Raf	Rapidly accelerated fibrosarcoma
Raptor	Regulatory associated protein of mTOR
RasGDP	Ras GTPase activating protein
RBD	Ras-binding domain
Ring	Really interesting new gene
RNA ou ARN	acide ribonucléique
RT	Température pièce
RTK	Récepteurs membranaires des tyrosines kinases

RT-PCR	reverse-transcriptase polymerase chain reaction
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SH2	Src-Homology 2
SH3	Src-Homology 3
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interference RNA
Smac/DIABLO	Second mitochondrial activator of caspases / direct IAP binding protein with a low pI
Src	Rous sarcoma oncogene cellular homolog
TAK1	TGF $\beta$ -activated kinase 1
TEP1	Transforming growth factor- $\beta$ -regulated and epithelial-cell enriched phosphatase 1
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor alpha
TIMPs	Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
TNFR2	Tumor necrosis factor receptor 2
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
TP53	Tumor protein 53
TRAF1	TNF- $\alpha$ -associated factors 1
TRAF2	TNF- $\alpha$ -associated factors 2
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TSC1	Tumor suppressor complexe 1
TSC2	Tumor suppressor complexe 2
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
UBA	Ubiquitin-associated
V	volts
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothéliale
XAF1	XIAP-associated factor 1
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
$\alpha$	alpha
$\alpha$ 2M	alpha 2 Macroglobulines

$\beta$	bêta
$\gamma$	gamma
$\delta$	sigma
$\Delta\Psi_m$	potentiel membranaire

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

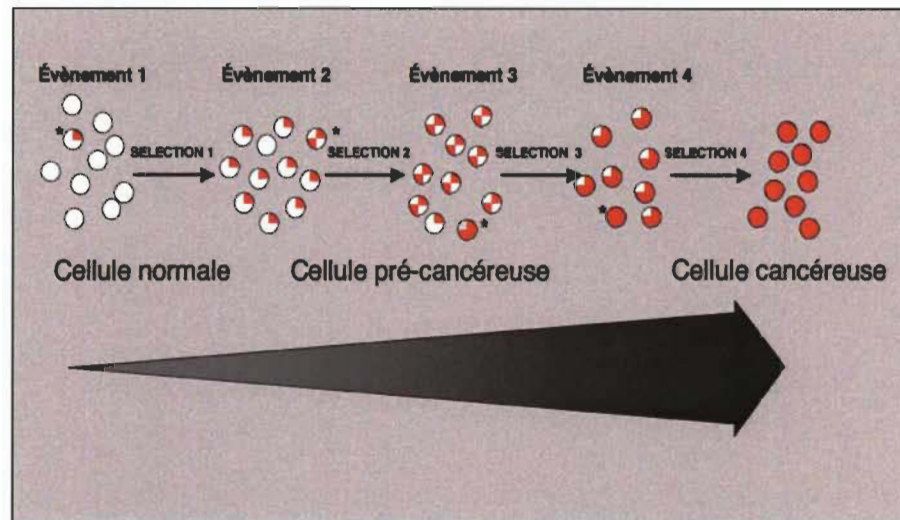
Selon les analyses statistiques et épidémiologiques, près de 4700 nouveaux cas du cancer de l'endomètre auront été diagnostiqués au Canada en 2011 (Société Canadienne du Cancer, 2010). Ainsi, le cancer de l'endomètre est la première pathologie gynécologique maligne et le quatrième type de cancer en importance chez la femme. Bien que ce type de cancer soit considéré comme étant hautement curable lorsqu'il est diagnostiqué précocement, la principale cause de décès du cancer endométrial est reliée à la présence de métastases : le taux de survie après 5 ans passant ainsi de 96 à 17 % (Jemal et al., 2010). Il est donc primordial de mieux comprendre les différents facteurs et les mécanismes qui sont impliqués dans le phénotype métastatique en plus de développer de nouveaux modèles d'études afin d'offrir un arsenal thérapeutique plus approprié aux femmes atteintes.

### **1.1 La carcinogenèse ou le développement d'un cancer**

#### **1.1.1 Généralités**

Les cancers sont des maladies qui découlent d'anomalies génétiques qui finissent par perturber la régulation entre la croissance, la division et la mort des cellules dans l'organisme. Le processus de cancérisation implique une multitude d'étapes successives (Figure 1.1). L'initiation de la transformation tumorale est due à l'apparition d'une première altération génétique, suite à des facteurs endogènes et/ou exogènes, qui entraîne une instabilité génique au sein d'une seule cellule. Cette instabilité va favoriser à son tour l'apparition d'autres altérations ainsi que la perte ou le gain de fonctions pouvant conférer à la cellule « anormale » des avantages sélectifs de survie et de prolifération. Ainsi, le cancer est la conséquence d'une accumulation de mutations du code génétique qui provoque une multiplication anarchique de cellules qui ont acquis

certaines caractéristiques leur permettant de se diviser indéfiniment (Willman and Hromas, 2006).



**Figure 1.1 : La transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse.**

Source : Dr Thierry Soussi, "Cancer Multistep", Institut Curie, Paris, 2007

Jusqu'à maintenant, plus de trois cent cinquante gènes, soit un peu plus de 1 % du génome humain, ont été reliés au développement du cancer (Willman and Hromas, 2006; Futreal et al., 2004). Bien que la grande majorité de ces gènes (approximativement 90 %) soient retrouvés seulement dans les cellules somatiques d'un tissu suite à une altération spontanée, 10 % des gènes altérés peuvent se retrouver dans les cellules germinales et possèdent ainsi un caractère transmissible (Futreal et al., 2004).

### 1.1.2 Les proto-oncogènes

Les proto-oncogènes sont un groupe de gènes normaux, hautement conservés, qui sont généralement impliqués dans la régulation, la prolifération et la différenciation cellulaire. Des altérations dans la structure et/ou dans l'expression d'un proto-oncogène peuvent l'activer en oncogène (gain de fonction) capable d'induire un phénotype néoplasique. Il suffit qu'un des deux allèles du gène soit modifié pour induire cette activité oncogénique. Plus d'une centaine d'oncogènes ont été identifiés à ce jour et



peuvent être classifiés en cinq catégories : 1) les facteurs de croissance, 2) les récepteurs des facteurs de croissance, 3) les transducteurs de signaux, 4) les facteurs de transcriptions et 5) les autres, incluant les régulateurs apoptotiques (Pierotti et al., 2006). Les oncogènes en lien avec notre première étude soit HER-2/neu et K-Ras, sont présentés ci-dessous alors que la protéine Akt est décrite dans la section 1.3.3.

#### ***1.1.2.1 HER-2/neu***

HER-2/neu (Human epidermal growth factor receptor-2), aussi appelé c-ErbB2 (ou ERBB2) est l'homologue humain d'un oncogène neu identifié dans l'ADN d'un neuroblastome de rat (Revillion et al., 1998; Shih et al., 1981). Localisé sur le chromosome 17q (Schechter et al., 1985), HER-2/neu encode pour une glycoprotéine transmembranaire membre de la famille des EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), p185neu (Coussens et al., 1985; King et al., 1985; Schechter et al., 1985; Wilson et al., 2005). Contrairement aux membres de sa famille, HER-2/neu ne possède pas une grande affinité pour lier directement un ligand. Il agit surtout comme un co-récepteur dans la dimérisation et l'activation des autres récepteurs : EGFR (ErbB1), HER-3 (ErbB3) et HER-4 (ErbB4) (Graus-Porta et al., 1997; Schechter et al., 1985; Tzahar et al., 1996; Wilson et al., 2005). L'amplification ou la survenue de mutations oncogéniques chez HER-2/neu lui confère une indépendance face à l'activation par les ligands et initie constitutivement son activité tyrosine kinase (Weiner et al., 1989; Wilson et al., 2005). Son couplage avec les récepteurs ErbBs lors d'une amplification du gène ou surexpression de la protéine entraîne donc un déséquilibre dans la formation d'homodimères (ex: EGFR-EGFR) au profit d'hétérodimères (ex: EGFR/HER-2 neu) possédant une activité intrinsèque (Wilson et al., 2005; Yarden and Sliwkowski, 2001).

Il a été démontré que la surexpression de HER-2/neu pouvait stimuler la voie de Ras/Raf/ MAPK (Ben Levy et al., 1994) ainsi que celle de PI-3K/Akt (Fedi et al., 1994) favorisant ainsi la transformation et la progression maligne. L'amplification du gène et/ou surexpression de la protéine HER-2/neu est retrouvée dans 25 à 30 % des cancers du sein (Berchuck et al., 1990), dans 26 % des cancers de l'ovaire (Slamon et al., 1989)

et dans 10 à 15 % des cancers de l'endomètre (Rolitsky et al., 1999). Lorsque le nombre de copies du gène HER-2/neu versus le centromère est inférieur à 4 dans une cellule, il s'agit d'une faible amplification du gène (Cianciulli et al., 2003).

### 1.1.2.2 *K-Ras*

K-ras qui est l'acronyme de «v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog» (McGrath et al., 1983) est membre de la famille des gènes *ras* (N-ras, H-ras et K-ras) qui sont activés par des mutations localisées dans les codons 12, 13 et 61 (Barbacid, 1987). Alors que les mutations de N-ras sont plus fréquemment retrouvées dans les leucémies myéloïdes (Bos et al., 1985; Bos, 1988) et ceux de H-ras dans les cancers de la vessie et du col de l'utérus (Lee et al., 1996; Riou et al., 1988), les mutations de K-ras sont retrouvées dans les adénocarcinomes du pancréas (Urban et al., 1993), du colon (Bos et al., 1987), des poumons (Rodenhuis and Slebos, 1992), de l'utérus et des ovaires (Enomoto et al., 1993). De 10 à 30 % des adénocarcinomes endométriaux présentent des mutations de K-ras (Ito et al., 1996; Sasaki et al., 1993). La mutation la plus fréquente est la substitution simple de la seconde base du codon 12 de K-ras codant pour une glycine (GGT → GAT) (Cho et al., 1997). Certaines études ont montré que la prévalence des mutations de K-ras dans les adénocarcinomes endométriaux serait plus élevée au sein de la population asiatique (25 %) que dans la population nord-américaine (12 %) (Enomoto et al., 1995; Sasaki et al., 1993).

Les gènes *ras* codent pour une protéine de 21 kDa appelée *ras* p21 ou RasGAP (Ras GTPase activating protein) qui est normalement située à la surface interne de la membrane cellulaire afin de participer à la transduction des signaux cellulaires capables de recruter et d'activer c-Raf ou PI 3-K/Akt, par exemple. Lorsque la protéine p21 est activée, elle lie une guanine triphosphate (GTP) et de par son activité enzymatique intrinsèque clive le phosphate terminal de la GTP qui est alors convertie en GDP, c'est-à-dire en guanine diphosphate. Le remplacement ou l'enlèvement de la glycine 12 (Gly<sup>12</sup>) empêche l'inactivation de l'activité GTPase de la protéine p21 favorisant la transformation cellulaire par son action constitutive (Barbacid, 1987).

### 1.1.3 Les suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs ou anti-oncogènes sont des inhibiteurs de la prolifération cellulaire. Contrairement aux oncogènes, les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeurs doivent être inactivés afin d'entraîner une perte de fonction conduisant à la transformation maligne. Cette perte de fonction peut être causée par une délétion dans le gène, une mutation ponctuelle ou une inhibition de la transcription du gène. À ce jour, près de 30 gènes suppresseurs de tumeurs impliqués dans le développement du cancer ont été identifiés (Park and Vogelstein, 2006). Un sous-groupe au sein des gènes suppresseurs de tumeurs est composé des gènes de réparation de l'ADN qui sont également inactivés dans les cancers humains. Bien que ces gènes soient plus passifs dans le contrôle de la prolifération cellulaire, leur inactivation entraîne une augmentation des mutations dans le génome qui peuvent affecter les proto-oncogènes et les suppresseurs de tumeurs (Park and Vogelstein, 2006).

Les altérations du gène suppresseur de tumeur p53 (TP53) sont parmi les plus recensées dans les cancers incluant les adénocarcinomes endométriaux. Les mutations dans le gène de p53 se retrouve dans 11 % des cancers de l'endomètre de grade I (Sherman et al., 1995) comparativement à plus de 45 % pour le grade III (Enomoto et al., 1993). p53 joue le rôle d'un facteur de transcription lorsqu'il est en présence de lésions de l'ADN ce qui permet soit l'arrêt du cycle cellulaire afin de procéder aux réparations de l'ADN ou soit l'induction de l'apoptose de la cellule affectée (Esteller et al., 1999). Également, le gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome TEN) est fréquemment muté dans le cancer de l'endomètre avec une prévalence de plus de 80 % des cas (Dedes et al., 2010). La description plus détaillée de PTEN est retrouvée dans la section 1.3.4.

## **1.2 L'apoptose et la survie cellulaire**

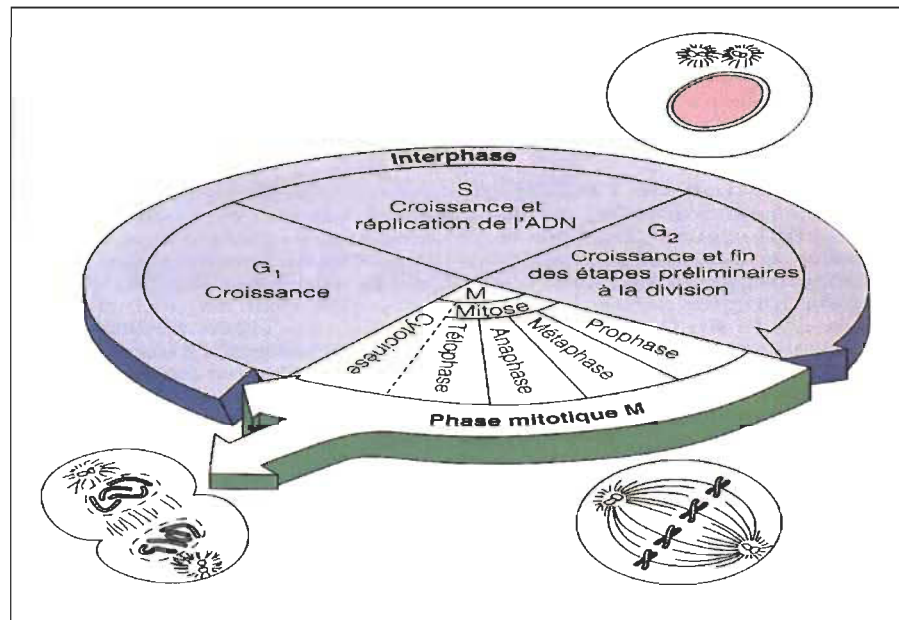
### **1.2.1 Généralités**

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un mécanisme physiologique complexe et très régulé qui est impliqué dans le développement, la croissance et le maintien des tissus normaux. Ce processus permet de contrôler le nombre de cellules dans un tissu ou dans un organe via le déclenchement de l'autodestruction cellulaire. Il permet d'éliminer les cellules endommagées ou âgées afin de préserver l'intégrité de l'organisme. L'apoptose peut être induite par la perte d'un signal de survie cellulaire ou par la réception d'un signal apoptotique (Geske and Gerschenson, 2001). Dans les tissus adultes sains, l'apoptose est en constante équilibre avec la division cellulaire. Les altérations de la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose sont donc impliquées dans la pathogénèse de certaines maladies neurodégénératives, dans le cancer et même dans certains désordres immunitaires (Thompson, 1995)

### **1.2.2 Le cycle de division cellulaire**

Le cycle de division cellulaire est une suite d'évènements ordonnés qui comprend les différentes étapes de vie d'une cellule de sa formation jusqu'à sa propre division. Ainsi, le cycle cellulaire se divise en deux grands stades : l'interphase, pendant laquelle la cellule croît mais ne se divise pas et la phase mitotique (phase M), pendant laquelle elle se divise. L'interphase est la période la plus longue du cycle cellulaire avec approximativement 95 % de sa durée et se divise en 3 sous-phases de transitions nommées  $G_1$  (Gap 1), S (Synthèse) et  $G_2$  (Gap 2) (Figure 1.2). La phase  $G_1$  est une phase métabolique très active et correspond à la croissance cellulaire. La phase de synthèse S est caractérisée par la croissance cellulaire et la duplication du matériel génétique. Finalement, la phase  $G_2$ , aussi appelée la phase pré-mitotique, débute dès que la réplication de l'ADN est achevée et permet à la cellule de se préparer pour la division cellulaire. Aussi dans cette phase, un important mécanisme de surveillance de l'intégrité de la réplication de l'ADN (point de surveillance  $G_2/M$ ) peut intervenir afin de bloquer l'entrée en mitose si le matériel génétique a subi des dommages (Marieb, 1999b).

Quant à elle, la phase mitotique ou la division cellulaire comprend deux évènements distincts : la division du noyau ou mitose et la division du cytoplasme, la cytokinèse. La mitose est classiquement divisée en 4 phases qui se succèdent sans à-coup : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La phase mitotique est la phase la plus courte du cycle cellulaire avec une durée moyenne de deux heures. Certaines cellules ne se divisent pas, elles sont dites en quiescence ou aussi en phase  $G_0$  (Marieb, 1999b).



**Figure 1.2 : Le cycle cellulaire.**

Tiré de Marieb EN, « Anatomie et Physiologie Humaines », 2e édition, Édition ERPI(1999).

Sous l'effet de signaux mitogènes, les cellules entament un cycle de division via la régulation de la famille des protéines kinases cyclines-dépendantes (CDKs) (Meijer L, 2003). Il existe une grande variété de facteurs mitogènes qui agissent, en général, par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires de type tyrosine kinase ou couplés à des protéines G (Meijer L, 2003).

### 1.2.3 Évènements apoptotiques

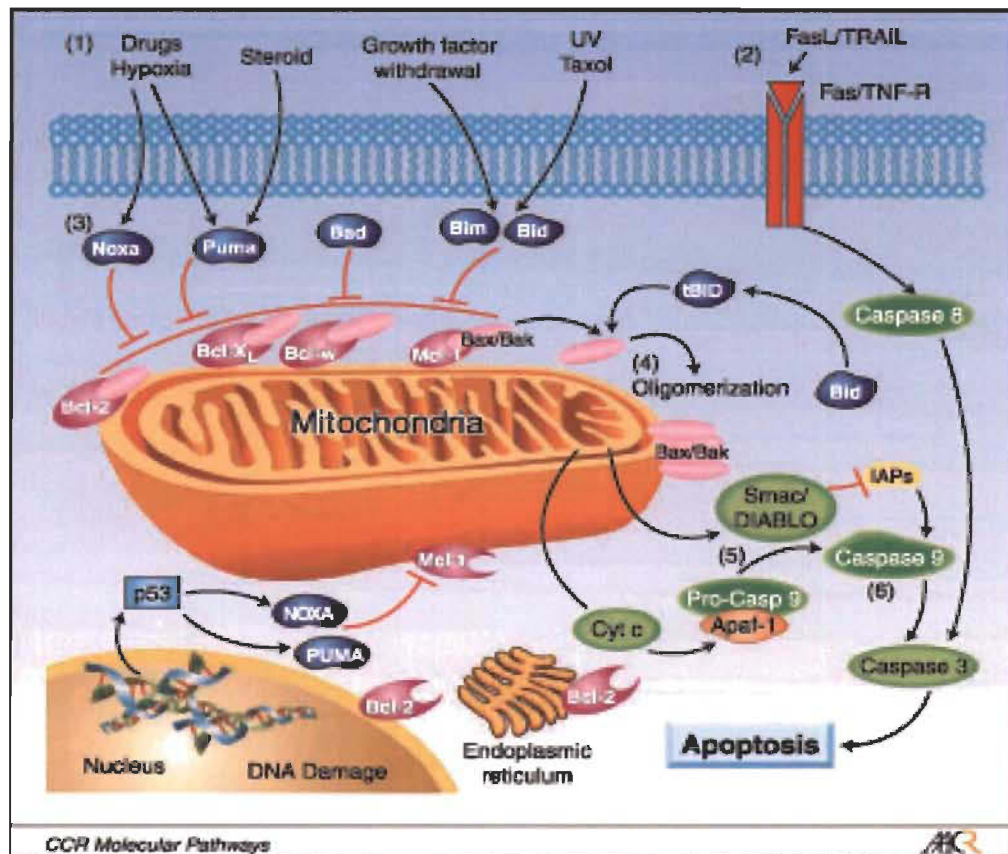
Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose ont été décrites pour la première fois par Kerr en 1972. La cellule apoptotique est caractérisée par le bourgeonnement de sa membrane plasmique, l'agrégation des organites et la diminution de son volume cytoplasmique, la perte d'adhésion et du contact cellulaire avec les cellules voisines et/ou avec la membrane basale ainsi que par la condensation et la fragmentation de sa chromatine (Kerr et al., 1972; Zimmermann et al., 2001). Les caractéristiques biochimiques apoptotiques quant à elles sont associées principalement au clivage de l'ADN en fragments de 50 à 300 kb puis en des fragments inter-nucléosomales de 180 à 200 pb (Cohen et al., 1994; Brown et al., 1993), à l'externalisation de phosphatidylsérines sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Martin et al., 1995) et au clivage protéolytique de substrats intracellulaires par les caspases (Martin and Green, 1995). Finalement, les changements qui surviennent au niveau de la membrane plasmique de la cellule apoptotique attirent spécifiquement les macrophages du système immunitaire afin qu'ils phagocytent rapidement les corps apoptotiques qui contiennent du cytoplasme, des organites et du matériel génétique fragmenté (Fadok et al., 1992) et ce, sans induire de réponse inflammatoire.

Les gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose ont d'abord été identifiés chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Ellis et al., 1991) comme étant CED-3, CED-4 et CED-9 ; rapidement, leurs homologues humains ont été déterminés. Ainsi, CED-3 correspond à la super famille des caspases (Kumar, 2007), exécuteurs apoptotiques, alors que CED-4 quant à lui est l'homologue de Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) (Vaux, 1997), impliqué dans l'activation des caspases. Finalement, CED-9 est l'équivalent de la famille de Bcl-2 (Jacobson, 1997) retrouvée chez l'humain et qui joue un rôle primordial dans le déclenchement du processus apoptotique.

### 1.2.3.1 *La famille de Bcl-2*

La famille de Bcl-2 (B cell lymphomas-2) compte jusqu'à maintenant plus de 25 membres caractérisés par une structure relativement commune allant de un à quatre domaines homologues de Bcl-2 (BH) désignés BH1, BH2, BH3 et BH4 (Adams and Cory, 1998). La famille Bcl-2 se divise en trois catégories fonctionnelles (Youle and Strasser, 2008). Le premier groupe est constitué des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Bcl-W, Mcl-1 et A1, contenant trois ou quatre des domaines BH et protège la cellule contre les stimuli apoptotiques. Le second groupe comprend les protéines formées du seul domaine BH3 soit Bad, Bid, Bim, Puma, Noxa, et Bik. Ces protéines activées en réponse aux diverses sources de stress cellulaire tels que les dommages à l'ADN, la privation de facteurs de croissance et le stress du réticulum endoplasmique, initient le processus apoptotique. Le troisième groupe, Bax, Bak et Bok a aussi un rôle pro-apoptotique (effecteurs) en dépit du fait que ces protéines contiennent les quatre domaines BH. Les protéines Bcl-2 anti-apoptotiques (Bcl-2 et Bcl-X<sub>L</sub>) sont généralement localisées au niveau de la membrane externe de la mitochondrie alors que les protéines pro-apoptotiques peuvent être retrouvées tant au niveau du cytoplasme qu'au niveau de la membrane mitochondriale (Zhu et al., 1996). Ces protéines peuvent aussi être retrouvées au niveau du réticulum endoplasmique et/ou au niveau de l'enveloppe nucléaire.

En réponse à un signal apoptotique, les protéines Bcl-2 pro-apoptotiques s'activent et subissent un changement de conformation permettant d'exposer leurs domaines BH3 (Desagher et al., 1999) et de se lier aux protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 afin de les inhiber en formant des hétérodimères (Green, 1998). C'est la balance entre les protéines Bcl-2 anti- et pro-apoptotiques et leurs interactions entre elles — formation d'homo- ou d'hétérodimères — qui détermine l'activation de Bax (Bcl-2 associated X protein) et Bak (Bcl-2-antagonist/killer) (Nechushtan et al., 2001; Griffiths et al., 1999; Nechushtan et al., 1999) et entraîne l'apoptose (Figure 1.3).



**Figure 1.3 : Voies de signalisation menant à l'apoptose.**

Tiré de Kang MH et al., "Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic Pathways in Cancer Therapy", Clin. Cancer Research 2009; 15 (4) : 1126-1132

Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL agissent comme des régulateurs du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial ce qui permet à la mitochondrie de maintenir ou d'augmenter son potentiel membranaire ( $\Delta\Psi_m$ ) nécessaire à la survie cellulaire tandis que les protéines pro-apoptotiques produisent plutôt l'effet contraire (Zhu et al., 1999). De plus, Bcl-2 et Bcl-XL inhibent directement Bax et Bak en formant un hétérodimère avec eux (Oltvai et al., 1993). Ces hétérodimères sont déstabilisés par les protéines BH3 seulement.

Bad (Bcl-XL/Bcl-2-associated death promoter) fait partie du groupe de protéines pro-apoptotiques avec un seul domaine BH3 et est la première composante du processus apoptotique à être régulée par Akt (Yang et al., 1997) via la phosphorylation de ses



sérines 112, 136 (Gajewski and Thompson, 1996). Lorsqu'elle est phosphorylée sur la sérine 136, Bad est séquestrée dans le cytoplasme par la protéine 14-3-3, l'empêchant ainsi de s'intégrer à la membrane mitochondriale (Muslin et al., 1996) et de former un hétérodimère avec Bcl-XL ou Bcl-2 (Yang et al., 1997) via son domaine BH3. Lorsque Bad n'est pas phosphorylée, elle se lie donc avec Bcl-2 ou Bcl-XL libérant Bax ou Bak et induisant ainsi le processus apoptotique (Ku et al., 2010; Yang et al., 1995). L'activation de Bax et Bak entraîne un changement de conformation ainsi que l'auto-association de ces deux protéines conduisant à la formation de larges oligomères qui vont perméabiliser la membrane externe de la mitochondrie en formant des canaux ioniques et entraînant le relâchement de facteurs apoptogènes (Antonsson et al., 1997).

**Tableau 1.1**  
Les protéines anti- ou pro-apoptotiques.

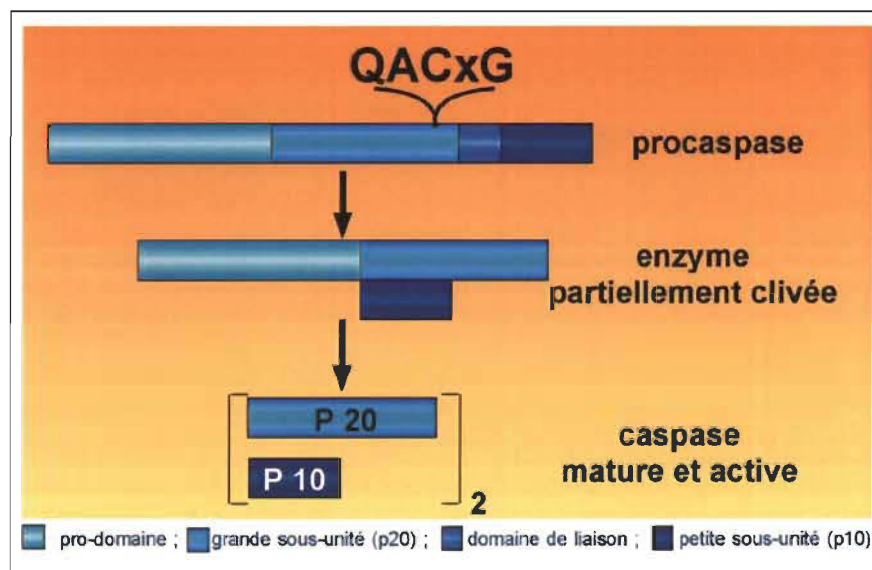
Anti-apoptotique	Pro-apoptotique
Akt	PTEN
Bcl-2	Bad
Bcl-XL	Bid
Bcl-W	Bim
Mcl-1	Puma
A1	Noxa
Xiap	Bik
cIAP-1	Bax
cIAP-2	Bak
	Smac/DIABLO
	Apaf-1
	Caspases

### ***1.2.3.2 La famille des Caspases***

La cascade des caspases (cysteine aspartic acid-specific proteases) joue un rôle essentiel dans l'orchestration de la mort cellulaire programmée (Alnemri et al., 1996). Les caspases, au nombre de quatorze, sont une famille de protéases pouvant se diviser en deux groupes : celles en lien avec l'inflammation (ICE (Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme)) soient les caspases-1, -4, -5, -11, -12, -13 et -14 et celles en relation avec

l'apoptose (CED-3) soient les caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10. Les caspases partagent des similarités dans leurs séquences d'acides aminés, leurs structures et la spécificité de leurs substrats (Nicholson and Thornberry, 1997). Ainsi, elles sont toutes présentes dans les cellules sous forme de pro-enzymes c'est-à-dire sous forme latentes ou inactives et contiennent toutes trois domaines : un pro-domaine N-terminal, une large sous-unité catalytique contenant un site actif hautement conservé QACXG et une petite sous-unité C-terminal (Figure 1.4) (Nicholson and Thornberry, 1997). De plus, les caspases clivent à un résidu aspartate (Asp) du côté C-terminal de substrats contenant le motif Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) (Garcia-Calvo et al., 1999).

Les caspases en relation avec l'apoptose peuvent être divisées en deux classes selon la longueur de leur pro-domaine : a) les caspases initiatrices qui possèdent un long pro-domaine, les caspases -2, -8, -9 et -10, pouvant enclencher la cascade d'activation des caspases et b) les caspases effectrices qui possèdent un court pro-domaine, les caspases -3, -6 et -7, propageant la cascade et activées par le clivage protéolytique des autres caspases (Slee et al., 1999).



**Figure 1.4 : Structure et activation des caspases.**

Adapté par Dr Jean-Erhlend Ricci de Rathmell and Thompson, "The central effectors of cell death in the immune system", 1999, 17: 781-828

L'activation d'une caspase en une protéase fonctionnelle implique la formation d'un homodimère et le clivage protéolytique de la pro-enzyme en des sous-unités : soit par auto-protéolyse ou par une autre caspase. La plupart des caspases possèdent deux sites de clivages contenant un ou deux résidus aspartates qui sont situés à la jonction des sous-unités (Stennicke and Salvesen, 1998). Le premier clivage divise la caspase en deux sous-unités, une grande et une petite, tandis que le deuxième clivage retire le pro-domaine N-terminal. La caspase activée est donc un tétramère composé de deux petites sous-unités de 10 et 14 kDa et de deux grandes sous-unités de 17 et 21 kDa, avec deux sites actifs (Villa et al., 1997; Wolf and Green, 1999).

Les caspases initiatrices possèdent dans leur pro-domaine des régions adaptatrices rendant possible la liaison des caspases avec des molécules induisant l'apoptose : le domaine de recrutement des caspases (CARD, caspase recruitment domain), le domaine de mort cellulaire (DD, death domain) ou le domaine effecteur de mort cellulaire (DED, death effector domain) (Wolf and Green, 1999). Ces régions rendent possible la liaison des caspases avec des récepteurs de mort de la famille des TNF (tumor necrosis factor) dont Fas, TNFR1 et TNFR2 (Zimmermann et al., 2001) ou avec Apaf-1 (Li et al., 1997b), leur permettant ainsi d'activer les caspases effectrices. Ces dernières interagissent avec a) des protéines cytoplasmiques telle que la  $\beta$ -caténine, qui diminue l'interaction cellule-cellule (Brancolini et al., 1997), b) avec des protéines nucléaires telle que la lamine A, qui provoque le désassemblage de la membrane nucléaire (Alnemri et al., 1996), c) avec des protéines impliquées dans le métabolisme ou la réparation d'ADN comme PARP (poly(ADP-ribose)polymerase) (Casciola-Rosen et al., 1996) ainsi que de nombreuses autres molécules dont d'autres caspases.

#### **1.2.4 La voie apoptotique intrinsèque ou mitochondriale**

La voie apoptotique intrinsèque est activée en réponse à de nombreux stress cellulaires tels que les dommages à l'ADN, l'hypoxie, la perte de signaux de croissance et l'inhibition de l'activité de protéines kinases dont Akt. Cette voie est en lien avec la famille de Bcl-2 et la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie qui

est considérée comme le « point de non-retour » dans cette voie apoptotique (Figure 1.3).

Ainsi donc, lorsque la cellule est soumise à un stress cellulaire, la protéine Bad est activée : elle se dissocie de la protéine cytosolique séquestrice 14-3-3. Bad peut ainsi libérer Bax ou Bak en se liant et formant un hétérodimère avec une protéine Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub> au niveau de la membrane mitochondriale. L'activation de Bax et Bak entraîne la formation de pores dans la membrane mitochondriale causant le relâchement de cytochromes c (Liu et al., 1996) ainsi que des protéines Smac/DIABLO (second mitochondrial-derived activator of caspase) (Du et al., 2000) et AIF (apoptosis inducing factor) (Kroemer et al., 1997) dans le cytoplasme. L'augmentation de la concentration de cytochrome c dans le cytoplasme entraîne la formation d'un apoptosome (Tsujimoto, 1998), complexe multiprotéique formé de Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1), de cytochrome c, d'ATP et de la pro-caspase-9. Sous l'action du cytochrome c, l'interaction entre l'Apaf-1 via son domaine CARD et la pro-caspase-9 enclenche l'activité protéolytique de cette dernière qui entraîne à son tour le clivage et l'activation des pro-caspases. Le cytochrome c est aussi nécessaire pour l'activation des caspases -2, -3, -6, -7, -8 et -10 qui participent au clivage d'une panoplie de substrats impliqués dans le processus apoptotique (Slee et al., 1999) (voir section 1.2.3). Finalement, AIF induit l'apoptose en activant des endonucléases nécessaires pour la fragmentation de l'ADN (Kroemer et al., 1997) alors que Smac/DIABLO est un inhibiteur de la famille des IAPs (inhibitor of apoptosis) favorisant l'activation des caspases (Du et al., 2000).

### **1.2.5 La voie apoptotique extrinsèque**

La voie apoptotique extrinsèque est induite par l'activation des récepteurs de mort cellulaire de la famille de TNF tels que TNFR1 et Fas ainsi que DR4/DR5 (death receptor 4 and 5) (Ashkenazi, 2002; Fulda and Debatin, 2006; Debatin and Krammer, 2004; Rowinsky, 2005). Cette activation via la liaison d'un ligand tel que Fas (FasL), TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) ou TNF provoque

rapidement l'agrégation des récepteurs et le recrutement de la protéine adaptatrice FADD (Fas-associating protein with death domain) via son domaine DD. De plus, cette protéine possède un domaine DED qui lui permet de lier la pro-caspase-8 ou -10 (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 1995; Wang et al., 2001). La formation de ce complexe de mort cellulaire (DISC, death-inducing signaling complex) entraîne une proximité et une dimérisation entre les pro-caspases permettant leur auto-activation. Ainsi, les caspases activées vont à leur tour cliver les caspases exécutrices -3, -6 et -7 et enclencher le processus apoptotique (Ashkenazi, 2002; Ghobrial et al., 2005; Lavrik et al., 2005; Bao and Shi, 2007).

### **1.3 La voie de signalisation de PI 3-K/AKT**

#### **1.3.1 Généralités**

Il est maintenant bien connu que l'activation de la voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3'OH kinase/Akt (PI 3-K/Akt) est impliquée dans la survie, la prolifération et la croissance cellulaire et permet, entre autres, aux cellules de résister aux assauts apoptotiques (Downward, 2004). La voie de PI 3-K/Akt est activée en réponse à un large éventail de stimuli incluant des facteurs de croissances, plusieurs cytokines, le stress ainsi que par la protéine Ras (Chaudhry and Asselin, 2009; Sjolander et al., 1991; Wymann and Pirola, 1998). Les dysfonctionnements au niveau de la régulation de cette voie de signalisation sont impliqués dans plusieurs pathologies, dont le cancer.

Les effecteurs de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt (Figure 1.5) sont nombreux et se catégorisent selon leurs activités pro- ou anti-apoptotiques. Aussi, dans les prochaines sections, la présentation des différentes protéines impliquées dans cette voie et leurs interactions se limitera à celles étudiées dans le cadre de ce projet de recherche.

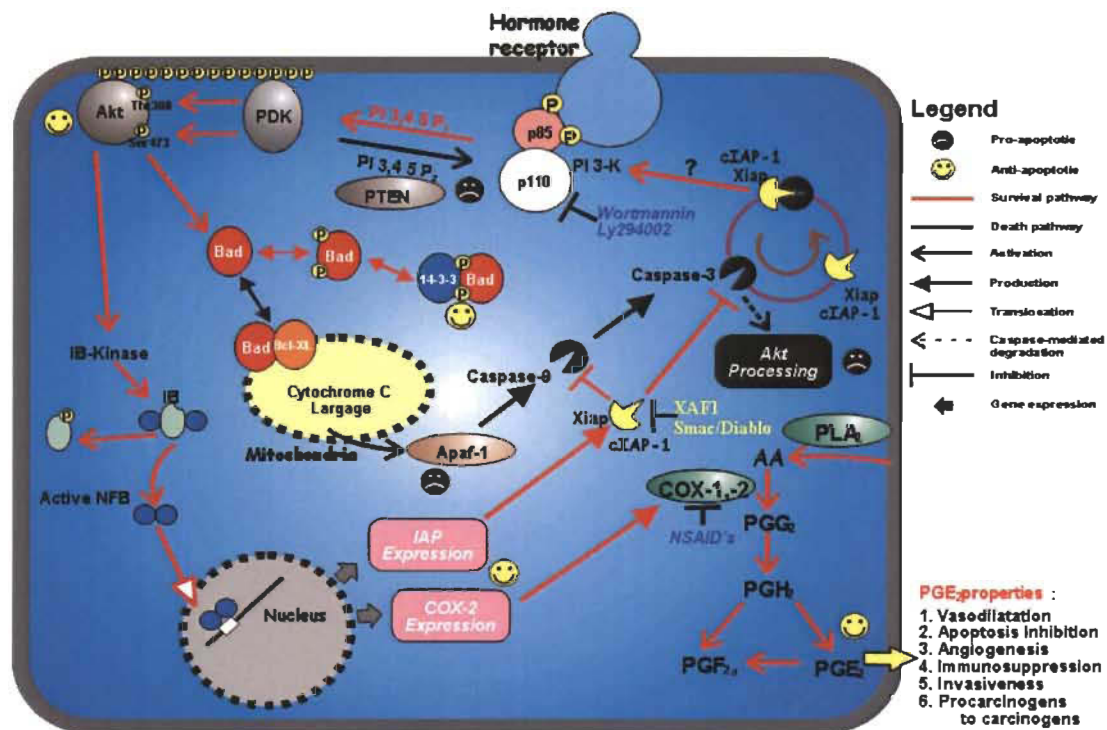


Figure 1.5 : Schématisation de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt.  
Laboratoire Dr Eric Asselin, UQTR

### 1.3.2 Phosphatidylinositol 3'OH kinase (PI 3-K)

Cantley et ses collègues (Whitman et al., 1985; Sugimoto et al., 1984; Macara et al., 1984; Auger et al., 1989) ont démontré pour la première fois, dans le milieu des années 1980, que PI 3-K était impliqué dans le processus de transformation oncogénique et mitogénique en phosphorylant le groupement hydroxyle en position D3 des phosphatidylinositols (PtdIns). Les PI 3-Ks font partie d'une grande famille de lipides kinases divisée en 3 classes (classe I, II et III) selon leurs caractéristiques structurales et la spécificité envers leurs substrats *in vitro* (Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999b).

### 1.3.2.1 La classe I de PI 3-K

La classe I des PI 3-K sont des hétérodimères composés de sous-unités régulatrices (p85) et catalytiques (p110) capable de phosphoryler le phosphatidylinositol (PtdIns ou PI), le phosphatidylinositol 4-phosphate (PtdIns 4-P ou PIP) et le phosphatidylinositol 4,5-diphosphate (PtdIns (4,5)P<sub>2</sub> ou PIP<sub>2</sub>), avec une préférence marquée pour ce dernier (Hawkins et al., 1992; Stephens et al., 1991). Généralement activée par les récepteurs membranaires des tyrosines kinases (RTK), la sous-unité régulatrice p85 peut s'associer directement aux tyrosines kinases via l'interaction de ses domaines SH2 avec les résidus phosphotyrosines des tyrosines kinases qui sont présentées selon la séquence consensus YXXM (Segal and Greenberg, 1996). La sous-unité p85 peut aussi se lier indirectement via une molécule adaptatrice comme dans le cas des récepteurs à insuline (IRS) (Vivanco and Sawyers, 2002; White, 1998; Clark and Brugge, 1995). Finalement, p85 peut aussi être activée par des récepteurs membranaires à protéine G (GPCR) (Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999a; Wymann and Pirola, 1998). Deux gènes codent pour les isoformes de la sous-unité régulatrice p85, soit *Pik3r1* pour l'isoforme p85 $\alpha$  et *Pik3r2* pour p85 $\beta$ . Le gène *Pik3r1* produit aussi deux autres transcrits codant, p55 $\alpha$  et p50 $\alpha$  (Inukai et al., 1997) alors que le gène *Pik3r3* code pour la variante p55 $\gamma$  qui présente une structure très similaire à p55 $\alpha$  (Pons et al., 1995). La sous-unité la plus exprimée et étudiée, p85 $\alpha$ , possède à sa portion C-terminale deux domaines SH2 (Src-Homology 2) séparés par un inter-domaine SH2 (iSH2) qui lient constitutivement la sous-unité catalytique p110. À l'extrémité N-terminale de p85 $\alpha$ , le domaine SH3 (Src-Homology 3) et BCR (Breakpoint Cluster Region) ont un effet inhibiteur sur l'activité catalytique de la sous-unité p110. La liaison de phosphotyrosines avec les domaines SH2 contrecarre l'effet inhibiteur (Vivanco and Sawyers, 2002; Yu et al., 1998). Les variantes p55 $\alpha$  et p50 $\alpha$  ne possèdent pas les domaines SH3 et BCR ce qui pourrait expliquer leur plus grande capacité à activer p110 que p85 $\alpha$  (Ueki et al., 2000).

La sous-unité catalytique p110 est aussi encodée par trois gènes qui ont sensiblement la même structure de base : *Pik3ca* pour p110 $\alpha$ , *Pik3cb* pour p110 $\beta$  et *Pik3cd* pour p110 $\delta$ . Les trois isoformes de p110 contiennent un site de liaison avec la sous-unité régulatrice p85, un site de liaison avec l'oncogène Ras (RBD ou Ras-binding



domain) (Rodriguez-Viciano et al., 1994), un domaine C2 impliqué dans l'ancrage de PI 3-K à la membrane plasmique ainsi qu'un domaine kinase (Bader et al., 2005; Vivanco and Sawyers, 2002). Dans la plupart des types cellulaires, l'isoforme p110 $\alpha$  est retrouvé dans l'activation de PI 3-K par les tyrosines kinases et Ras alors que p110 $\beta$  répond à l'activation par les protéines G (GPCR) (Jia et al., 2009; Foukas et al., 2006). Quant à elle, l'expression de l'isoforme p110 $\delta$  est restreinte aux leucocytes (Chantry et al., 1997).

Plusieurs facteurs de croissance ou de survie cellulaire tels que IGF-1, TGF- $\alpha$  et EGF (Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999b), des hormones comme la 17 $\beta$ -oestradiol (Yu et al., 2004), des interleukines (Sizemore et al., 1999), des oncogènes tel que Ras (Pacold et al., 2000) et même des intégrines impliquées dans l'adhésion cellulaire (Keely, 2011; Shaw et al., 1997) peuvent activer PI 3-K. En réponse à une stimulation, la sous-unité catalytique p110 de PI 3-K est recrutée à la membrane plasmique via l'interaction de la sous-unité régulatrice p85 avec les phosphotyrosines des récepteurs des tyrosines kinases ou avec des molécules adaptatrices comme IRS-1/2 (Jia et al., 2009). La sous-unité catalytique p110 activée utilise le PIP<sub>2</sub> comme substrat principal afin de produire du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate ou PIP<sub>3</sub> (Jia et al., 2009). Subséquemment, le PIP<sub>3</sub> va agir comme second messenger en se liant au domaine pleckstrine (PH ou Pleckstrin Homology) des effecteurs de la voie de signalisation comme Akt et PDK-1 (3-phosphoinositides-dependent-kinase-1) afin de les recruter à la membrane plasmique pour activation (Jia et al., 2009; Stokoe et al., 1997). Le suppresseur de tumeur PTEN antagonise l'activité de PI 3-K en convertissant le PIP<sub>3</sub> en PIP<sub>2</sub> (Jia et al., 2009; Maehama and Dixon, 1998).

### ***1.3.2.2 Les classes II et III de PI 3-K***

Les membres de la classe II de PI 3-K phosphorylent électivement le PI et le PIP et peuvent phosphoryler le PIP<sub>2</sub> en présence de phosphatidylsérine (Domin et al., 1997). Cette classe est caractérisée par un domaine C2 en C-terminal (MacDougall et al., 1995). Bien que cette classe partage certaines homologies structurelles avec la classe I de



PI 3-K, elle possède un N-terminal différent qui ne s'associe pas avec la sous-unité régulatrice p85. De même, aucune molécule adaptatrice n'a été trouvée à ce jour ni le mécanisme de régulation pour cette classe. Quant à la classe III, il s'agit d'une PI 3-K spécifique qui utilise exclusivement le PI comme substrat afin de produire du phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns 3-P ou PI 3-P) et semble être impliqué dans le transport de protéines et de vésicules chez les levures (Schu et al., 1993; Zvelebil et al., 1996). À ce jour, seul les membres de la classe I de PI 3-K ont démontré qu'ils pouvaient interagir avec Akt et qu'une dérégulation de leur fonction pouvait être impliquée dans plusieurs cancers. Ainsi toute future référence à PI 3-K dans cet ouvrage présupera qu'il s'agit de la classe I de PI 3-K, à moins d'avis contraire.

### **1.3.2.3 L'inhibition de PI 3-K**

Les inhibiteurs de PI 3-K couramment utilisés sont la wortmannin et le LY294002. La wortmannin est tirée de la moisissure *Penicillium fumiculosus* qui inhibe la formation du PIP<sub>3</sub> en se liant irréversiblement à la lysine<sup>802</sup> de la sous-unité catalytique p110 de PI 3-K (Powis et al., 1994; Arcaro and Wymann, 1993). Le LY294002 (2-(4-morpholinyl)chromone) qui est un dérivé de flavonoïde est un inhibiteur spécifique, réversible et compétitif des sites de liaison de l'ATP de PI 3-K (Vlahos et al., 1994).

### **1.3.3 Akt/PKB/Rac et ses isoformes**

Akt (Activated by kinase tyrosine), aussi connue sous les noms de protéine kinase B (PKB) et Rac (Related to A and C protein kinase), est membre de la famille des AGC kinases. Akt a été identifiée chez l'humain en 1987 (Staal, 1987) comme étant un gène homologue de v-Akt, un oncogène exprimé par le rétrovirus AKT8 causant l'apparition de thymômes chez les souris AKR. Akt est une protéine sérine/thréonine kinase de 60 kDa qui est activée par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) en réponse à une multitude de facteurs et signaux cellulaires.

### *1.3.3.1 Les isoformes d'Akt*

La famille d'Akt comprend trois isoformes : Akt1 ou PKB $\alpha$ , Akt2 ou PKB $\beta$  et Akt3 ou PKB $\gamma$  codés par trois gènes différents situés respectivement sur les chromosomes 14q32.3 (Staal et al., 1988), 19q13.1-13.2 (Cheng et al., 1992) et 1q44 (Murthy et al., 2000). Les trois isoformes possèdent une structure très bien conservée avec près de 85 % d'homologie (Datta et al., 1999; Vanhaesebroeck and Alessi, 2000) comprenant un domaine pleckstrin (PH) à l'extrémité N-terminale, un domaine kinase catalytique central et une queue en C-terminal contenant un motif hydrophobique (Vanhaesebroeck and Alessi, 2000). Le domaine kinase d'Akt est très similaire à celui retrouvé chez la protéine kinase C (PKC) et protéine kinase A (PKA) tandis que la queue contenant le motif hydrophobique en C-terminal est analogue à une région régulatrice de l'activité kinase des membres de la famille des PKC (Kumar and Madison, 2005; Coffey et al., 1998; Bellacosa et al., 1993). L'activité enzymatique des kinases est tributaire de la phosphorylation des résidus sérine et thréonine retrouvés au sein du motif hydrophobique (FQPFSY). Toutefois, l'absence de ce motif hydrophobique chez Akt3 suggère l'existence d'un mécanisme d'activation différent entre les isoformes (Hanada et al., 2004; Andjelkovic et al., 1997; Konishi et al., 1995). Akt diffère des autres membres de la famille des AGC kinases par son domaine PH (Datta et al., 1995), domaine qui lui permet de lier préférentiellement le PIP<sub>3</sub> ainsi que le PIP<sub>2</sub> (James et al., 1996; Stephens et al., 1998).

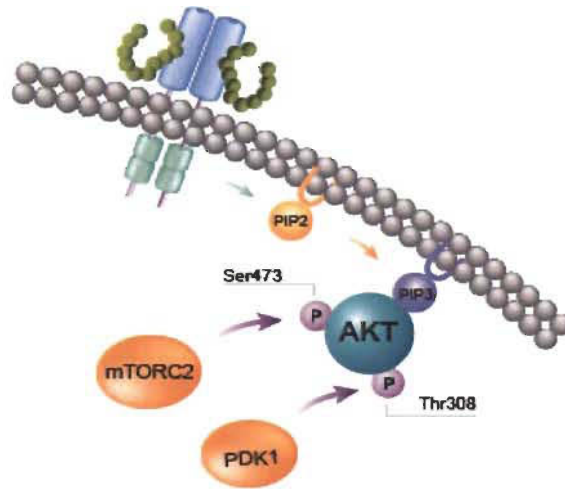
Tous les tissus expriment minimalement un isoforme d'Akt. Ainsi, Akt1 et Akt2 sont exprimés dans la plupart des tissus tandis que la distribution d'Akt3 est plus restreinte et se retrouve en plus grande quantité au niveau du cerveau, du corps calleux et des testicules (Boland et al., 2007; Coffey et al., 1998; Hers et al., 2011). Des études sur des souris déficientes en Akt1 ou Akt2 ont démontré que Akt1 est fortement impliqué dans la croissance et la survie cellulaire (Chen et al., 2001; Cho et al., 2001b; Yang et al., 2003; Hers et al., 2011) alors que Akt2 est en lien avec la régulation du glucose par l'insuline (Garofalo et al., 2003; Cho et al., 2001a; Hers et al., 2011). Ainsi, la caractérisation des souris déficientes en Akt1 et Akt2 a permis de confirmer la non-redondance dans les fonctions de ces deux isoformes. Les souris déficientes en Akt3

n'ont pas démontré de troubles reliés au métabolisme du glucose ni de croissance mais présentaient plutôt une diminution de 25 % de leurs masse cérébrale et un trouble du développement du corps calleux (Boland et al., 2007).

Bien que les isoformes d'Akt peuvent participer au processus oncogénique, Akt2 est l'isoforme qui est le plus souvent amplifié ou surexprimé dans les cancers humains avec 10 % des tumeurs pancréatiques (Cheng et al., 1996), 25 % des tumeurs ovariennes (Cheng et al., 1992), 40 % des carcinomes hépatocellulaires (Xu et al., 2004) et 57 % des cancers colorectaux (Roy et al., 2002; Hers et al., 2011). L'amplification d'Akt2 serait plus fréquente dans les tumeurs non-différenciées suggérant que les altérations affectant Akt2 peuvent être associées avec l'agressivité des tumeurs (Coffer et al., 1998). Bien qu'Akt1 ne soit pas fréquemment amplifié dans les cancers, l'équipe de Carpten a récemment identifié une mutation dans le domaine PH d'Akt1 qui entraîne constitutivement son activation dans les cancers du sein, des ovaires et colorectaux (Carpten et al., 2007). De récents travaux ont démontré qu'Akt3 serait impliquée dans le processus d'implantation de l'embryon et exprimée dans l'endomètre lors du post-partum (Veillette et al., 2013). Mais l'amplification du gène d'Akt3 n'a pas encore été rapportée dans les cancers humains bien que l'augmentation de son ARNm et de son activité ont été constatées dans les tumeurs du sein qui sont testées négatives pour les récepteurs oestrogéniques (Nakatani et al., 1999; Hers et al., 2011). L'augmentation ou l'activation de la voie d'Akt est reliée à un diagnostic sévère et un faible taux de survie dans plusieurs types de tumeurs : le mélanome (Dai et al., 2005), du sein (Perez-Tenorio and Stal, 2002) de la prostate (Kreisberg et al., 2004), de l'endomètre (Terakawa et al., 2003), gastrique (Nam et al., 2003), pancréatique (Schlieman et al., 2003) et du cerveau (Ermoian et al., 2002) (Hers et al., 2011). Finalement, une étude récente dans notre laboratoire sur les isoformes d'Akt a démontré que Akt 1 et 2 étaient impliquées dans la chimiorésistance au cisplatine et au taxol alors que les trois isoformes étaient nécessaires pour la résistance à la doxorubine (Girouard et al., 2013).

### 1.3.3.2 L'activation d'Akt

La protéine Akt est normalement maintenue inactive dans le cytosol où elle forme, *in vivo*, un complexe avec la PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) (Calleja et al., 2007). Le complexe Akt / PDK-1 est maintenu inactif via une interaction intramoléculaire entre le domaine PH et le domaine kinase d'Akt qui empêche la thréonine<sup>308</sup>, localisée dans la boucle d'activation d'Akt, d'être phosphorylée constitutivement par la PDK-1 (Calleja et al., 2007). L'augmentation de l'activité de la PI 3-K par des facteurs de croissance ou par des cytokines induit la production de PIP<sub>3</sub> et de PIP<sub>2</sub> dans la cellule. Ces phosphoinositides vont se lier aux domaines PH d'Akt et de la PDK-1 afin de les co-recruter à la membrane plasmique. La liaison des phosphoinositides sur le domaine PH d'Akt va aussi induire un changement de conformation de la protéine qui va permettre à la PDK-1 de phosphoryler la thréonine<sup>308</sup> (Calleja et al., 2007). L'activation maximale d'Akt requière aussi la phosphorylation de la sérine<sup>473</sup> dans le domaine hydrophobique (Alessi and Cohen, 1998). L'identité de la PDK-2 ((3-phosphoinositide-dependent protein kinase 2) responsable de la phosphorylation de la sérine<sup>473</sup> a fait longtemps l'objet d'hypothèses. Il a été proposé que ce soit Akt qui s'auto-phosphoryle (Toker and Newton, 2000) ou la MAPKAP kinase 2 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2) (Alessi and Cohen, 1998), une PDK-1 modifiée (Leslie et al., 2001; Balendran et al., 1999), une kinase liée à une intégrine ou ILK (integrin-linked kinase) (Delcommenne et al., 1998) ou une protéine kinase C (PKC) (Kroner et al., 2000) (Hers et al., 2011). De récentes évidences suggèrent que mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2) serait la kinase qui phosphoryle la sérine<sup>473</sup> d'Akt dans des conditions de croissance ou de stimulation mitogène (Figure 1.6) (Bozulic and Hemmings, 2009; Hresko and Mueckler, 2005; Sarbassov et al., 2005; Jacinto et al., 2006; Frias et al., 2006; Guertin et al., 2006; Shiota et al., 2006) alors que ce rôle serait attribué à la protéine kinase ADN-dépendante ou DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) en réponse aux stress cellulaires et aux dommages à l'ADN (Shiota et al., 2006; Bozulic et al., 2008; Surucu et al., 2008) (Hers et al., 2011).



**Figure 1.6 : L'activation d'Akt par la PDK-1 et mTORC2.**

Tiré de [www.htrf.com](http://www.htrf.com)

Suite à sa phosphorylation et son activation, Akt se dissocie de la membrane et de PDK-1 et se relocalise dans le cytosol et/ou le noyau afin d'activer ses nombreux effecteurs (Andjelkovic et al., 1997). L'activation d'Akt se termine par la déphosphorylation de la thréonine<sup>308</sup> et de la sérine<sup>473</sup> par l'action de la protéine phosphatase 2 ou PP2 (protein phosphatase 2) (Andjelkovic et al., 1996) et de la phosphatase au domaine PH riche en leucine ou PHLPP (PH domain leucine-rich repeat phosphatase) (Brognard et al., 2007) respectivement (Hers et al., 2011). Finalement, PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) peut aussi réguler négativement l'activation d'Akt en hydrolysant le PIP<sub>3</sub> en PIP<sub>2</sub> (voir section 1.3.4).

### **1.3.3.3 Les effecteurs d'Akt**

Akt est impliqué dans la régulation d'une panoplie de processus cellulaires incluant le métabolisme, la croissance, la prolifération, la survie cellulaire et l'angiogénèse, via la phosphorylation des sérines et/ou thréonines de ses nombreux substrats (Hers et al., 2011). Akt favorise la survie cellulaire en bloquant les fonctions

des protéines pro-apoptotiques et leurs processus. Akt phosphoryle directement BAD, un membre de la famille de BH3 (Bcl-2 homology domain 3) (voir section 1.3.3.1), sur la sérine<sup>136</sup> ce qui crée un site de liaison pour la protéine 14-3-3 qui séquestre BAD dans le cytosol. Ainsi, BAD ne peut pas se lier avec un membre de la famille de Bcl-2 afin de l'inhiber et ainsi favoriser l'apoptose par le relâchement du cytochrome c hors de la mitochondrie (Datta et al., 2000; Datta et al., 2002; Manning and Cantley, 2007). Akt inhibe aussi l'expression des protéines pro-apoptotiques BH3 via leurs facteurs de transcription comme dans le cas de FOXO et de p53. La phosphorylation de FOXO par Akt se produit dans le noyau et, tout comme pour BAD, se lie avec la protéine séquestrice 14-3-3 qui empêche la fixation du facteur de transcription sur ses gènes cibles pro-apoptotiques BIM (Dijkers et al., 2002), p27<sup>kip1</sup> (Burgering and Medema, 2003) et Fas Ligand (Brunet et al., 1999) (Manning and Cantley, 2007). Akt cible aussi la phosphorylation de MDM2 ce qui induit la translocation de ce dernier vers le noyau où il régule négativement p53, empêchant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Mayo and Donner, 2001; Zhou et al., 2001; Manning and Cantley, 2007). Akt phosphoryle aussi GSK-3 afin de l'inactiver. GSK-3 (Glycogen synthase kinase 3) est une kinase qui régule le stockage du glucose sous forme de glycogène en inhibant l'activité du glycogène synthase et qui serait aussi impliquée dans le processus de mort cellulaire via l'inhibition de Mcl-1, un membre anti-apoptotique de la famille de Bcl-2 (Maurer et al., 2006; Manning and Cantley, 2007). De plus, la GSK-3 activée favoriserait l'arrêt du cycle cellulaire par la dégradation des cyclines D1 et E ainsi que des facteurs de transcription c-Jun and c-Myc (Diehl et al., 1998; Wei et al., 2005; Welcker et al., 2003; Yeh et al., 2004). L'inactivation de GSK-3 par Akt favorise donc la survie cellulaire (Beurel and Jope, 2006; Hoeflich et al., 2000; Pap and Cooper, 1998).

Akt peut également prévenir l'apoptose induite par la cascade des caspases en phosphorylant directement la pro-caspase-9 ce qui bloque l'activité protéase intrinsèque de l'enzyme suivant le relâchement du cytochrome c hors de la mitochondrie (Cardone et al., 1998; Downward, 2004; Manning and Cantley, 2007; Hers et al., 2011). Akt peut aussi réguler positivement les facteurs de transcriptions conduisant à l'expression de protéines anti-apoptotiques ou pro-survie. Akt se lie et active les inhibiteurs de la kappa

B-kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) qui à son tour phosphoryle et favorise la dégradation du co-facteur inhibiteur de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B. Ainsi libéré, NF- $\kappa$ B se rend au noyau et stimule la transcription de gène anti-apoptotique tels que c-IAP-1, c-IAP-2 et Xiap (Nicholson and Anderson, 2002; Romashkova and Makarov, 1999).

Akt joue un rôle dans la synthèse de protéines via la voie de signalisation de mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex -1). Le complexe mTORC1 qui est composé d'une sous-unité catalytique mTOR, d'une protéine associée nommée Raptor (regulatory associated protein of mTOR) et de la protéine mLST8, est impliqué dans la biogenèse ribosomale, la traduction de protéines et la progression du cycle cellulaire (Hers et al., 2011; Manning and Cantley, 2007). mTOR peut aussi, lorsque les conditions de croissance ne sont pas optimales, empêcher les cellules de progresser de la phase G1 à l'initiation de la réplication de l'ADN (Bjornsti and Houghton, 2004). Akt régule positivement la voie de mTORC1 en inhibant par phosphorylation le complexe de gènes suppresseurs de tumeurs TSC1 et TSC2 (tumor suppressor complexe 1 et 2) ainsi que PRAS40 (proline rich Akt substrate of 40 kDa). mTORC1 peut alors phosphoryler ses cibles a) le 4E-BP1 (4E (eIF4E)-binding protein 1), ce qui résulte par la libération du facteur d'initiation de la transcription eIF4E et par l'augmentation de la traduction de c-Myc (Bjornsti and Houghton, 2004; Dilling et al., 2002) et b) la p70 S6 kinase ribosomale (p70S6K) qui phosphoryle la sous-unité ribosomale 40S afin d'augmenter la traduction d'ARNm contenant une région riche en oligopyrimidine à leur extrémité 5' qui codent pour des protéines de traduction (Fenton and Gout, 2011).

Finalement, plusieurs études ont aussi démontré l'implication d'Akt dans la migration des cellules tumorales et la formation des métastases (Arboleda et al., 2003; Dillon and Muller, 2010; Tanno et al., 2001; Chung et al., 2001; Park et al., 2001; Kim et al., 2001). La surexpression d'Akt stimulerait la sécrétion des métalloprotéinases aptes à dégrader la matrice extracellulaire (Arboleda et al., 2003; Park et al., 2001; Kim et al., 2001), l'induction du EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) qui se traduit par la diminution des protéines de l'adhésion cellulaire telles que la E-cadhérine et la  $\beta$ -caténine ainsi que par une réorganisation de l'actine nécessaire à la motilité cellulaire

(Grille et al., 2003; Chin and Toker, 2009). Aussi, Akt est impliqué dans la production des prostaglandines via COX-2 ce qui favorise l'agressivité des cellules cancéreuses (voir section 1.5.5).

### 1.3.4 PTEN/MMAC/TEP1

Identifié en 1997 sur le chromosome 10q23 (Li et al., 1997a), PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) est aussi connu sous le nom de MMAC (mutated in multiple advanced cancers) (Steck et al., 1997) ou de TEP1 (transforming growth factor- $\beta$ -regulated and epithelial-cell enriched phosphatase 1) (Li and Sun, 1997). Avec 30 % des cas (Chagpar et al., 2010), PTEN est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers chez l'humain après p53 (Keniry and Parsons, 2008). Le gène PTEN code pour une protéine de 403 acides aminés (a.a.) présentant une activité phosphatase protéique et lipidique.

#### 1.3.4.1 *Structure de la protéine PTEN*

La région N-terminale (environ 180 a.a.) de la protéine PTEN contient un très court domaine de liaison aux  $\text{PIP}_2$  ainsi qu'un domaine phosphatase catalytique Cys-X<sub>5</sub>-Arg-Thr/Ser (CX5RT/S) qui est retrouvée chez les membres de la superfamille des protéines tyrosines phosphatases (PTPs) (Lee et al., 1999; Maehama et al., 2001). Toutefois, la protéine PTEN ne partage pas d'autres homologies avec cette famille en dehors de ce motif (Liu and Bankaitis, 2010). Le site actif du domaine phosphatase de PTEN est beaucoup plus large et profond que celui des autres phosphatases et ce, afin de mieux lier le phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate ( $\text{PIP}_3$ ) et autres substrats lipidiques plus petits (Lee et al., 1999). De plus, la présence de deux résidus chargés positivement, les lysines <sup>125</sup>, <sup>128</sup>, dans le site actif du domaine phosphatase contribue à améliorer l'interaction avec les phosphoinositides qui sont chargés négativement. Les mutations qui surviennent dans ce domaine perturbent l'activité phosphatase protéique et/ou lipidique de PTEN (Myers et al., 1997). Certaines modifications réversibles peuvent aussi affecter le fonctionnement du domaine phosphatase de PTEN soit l'oxydation de la



cystéine<sup>124</sup> (Lee et al., 2002) ou l'acétylation des lysines<sup>125, 128</sup> (Okumura et al., 2006) (Georgescu, 2010).



**Figure 1.7 : Schématisation de la structure de PTEN.**

Tirée de Georgescu MM, "PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control", Genes Cancer, 2010 Dec; 1 (12) : 1170-7

PIP<sub>2</sub>-binding motif : site de liaison au phosphatidylinositol 4,5-diphosphate

PEST : domaine (Proline, acide glutamique, Serine, Threonine)

PDZ-binding motif: PSD95/Dlg/Z01

PTEN contient également un domaine C2 (environ 165 a.a.) (Figure 1.7) qui est essentielle à la liaison de la protéine aux phospholipides membranaires et qui participe aussi à l'activité du domaine phosphatase (Das et al., 2003) ainsi qu'à la stabilité de la protéine (Wang et al., 2008). Des mutations dans le domaine C2 mais aussi dans le domaine phosphatase provoquent un mauvais repliement de la protéine ce qui diminue significativement son activité enzymatique et sa demi-vie (Georgescu et al., 1999; Georgescu et al., 2000; Georgescu, 2010). La demi-vie normale de la protéine PTEN est de deux heures (Georgescu et al., 1999).

La région C-terminale de PTEN (environ 50 a.a.) contient un site de liaison PDZ (PSD95/Dlg/Z01) qui est impliqué dans l'interaction protéine-protéine (Fanning and Anderson, 1999; Georgescu et al., 1999; Vazquez et al., 2000) et deux domaines PEST (proline, glutamic acid, serine, threonine) qui régulent la stabilité de la protéine (Georgescu et al., 1999). La phosphorylation des résidus sérines<sup>362, 370, 380, 385</sup> et thréonines<sup>366, 382, 383</sup> des domaines PESTs provoque un changement de conformation dite «fermée» de la protéine qui augmente la stabilité de PTEN mais qui diminue son interaction avec les phospholipides et par le fait même son activité phosphatase. Plusieurs kinases participent à la phosphorylation des résidus des domaines PESTs mais

principalement la protéine kinase CK2 (casein kinase II), qui phosphoryle constitutivement *in vivo* les sérines<sup>370, 380, 385</sup> et la thréonine<sup>383</sup> de PTEN (Torres and Pulido, 2001) ainsi que la GSK-3 $\beta$  qui phosphoryle la sérine<sup>362</sup> et la thréonine<sup>366</sup> (Al Khouri et al., 2005). La déphosphorylation de ces sites entraîne rapidement le recrutement de PTEN à la membrane plasmique, son activation enzymatique puis sa dégradation (Das et al., 2003; Torres and Pulido, 2001; Vazquez et al., 2000). Quelque 43 % des mutations de PTEN surviennent dans la région C-terminale de la protéine entraînant la production de protéines PTEN mutées ou tronquées qui sont alors rapidement dégradées même si les mutations ou délétions n'affectent pas l'activité enzymatique de la protéine (Lee et al., 1999). Deux mécanismes de dégradation de la protéine PTEN ont été identifiés jusqu'à maintenant : le clivage de PTEN par la caspase-3 (Torres et al., 2003) et l'ubiquitination par NEDD4-1 (Wang et al., 2007) (Georgescu, 2010).

Finalement, certaines mutations de PTEN affectent sa localisation dans la cellule soit par séquestration au niveau du noyau (Denning et al., 2007) ou en interférant avec le recrutement de PTEN à la membrane plasmique (Das et al., 2003; Walker et al., 2004) (Georgescu, 2010).

#### ***1.3.4.2 Les fonctions biologiques de PTEN***

La principale fonction de PTEN est de réguler négativement la voie de signalisation de PI 3-K/Akt en s'opposant à l'action de la PI 3K et en empêchant l'activation/phosphorylation de la sérine/thréonine kinase Akt. Plus précisément, PTEN convertit le PIP<sub>3</sub> en PIP<sub>2</sub>, sa forme inactive, en déphosphorylant l'anneau inositol en position D3 du PIP<sub>3</sub> (Maehama and Dixon, 1998). PTEN peut aussi induire une diminution de la prolifération par l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou l'apoptose via la p27 et la cycline D1 (Furnari et al., 1998; Radu et al., 2003). Différentes études ont démontré que PTEN pouvait également a) inhiber la migration cellulaire via la déphosphorylation de la FAK (focal adhesion kinase) (Tamura et al., 1998), b) générer ou soutenir la polarité des cellules épithéliales par le biais de la Cdc42 (Martin-Belmonte

et al., 2007), c) augmenter la stabilité chromosomale par son interaction avec la protéine centromérique CENP-C (Shen et al., 2007) et d) augmenter la transcription de Rad51 qui participe à la réparation du double brin d'ADN (Shen et al., 2007).

Les mutations et/ou délétions somatiques du gène suppresseur de tumeur PTEN ont été retrouvées dans la plupart des types de cancers et plus particulièrement dans les glioblastomas, les cancers de la prostate, de l'endomètre, du sein, du côlon et des poumons (Simpson and Parsons, 2001). Une étude sur des souris avec le phénotype PTEN<sup>+/-</sup>, a démontré l'implication de PTEN dans les premières étapes de la carcinogenèse du cancer de l'endomètre : 100 % des souris ont développé des hyperplasies de l'endomètre et 20 % des cas ont évolué vers des carcinomes endométriaux (Hecht and Mutter, 2006; Stambolic et al., 2000). La diminution de l'expression de PTEN ou son inactivation entraînerait une activation/phosphorylation augmentée voire constitutive d'Akt chez les cellules embryonnaires et tumorales (Denning et al., 2007; Gagnon et al., 2003; Podsypanina et al., 2001; Kanamori et al., 2001). De plus, les mutations/délétions de PTEN combinées à l'activation d'Akt ont été associées avec la résistance aux agents chimiothérapeutiques tels que le cisplatine et la doxorubicine (Lee et al., 2005; Wan et al., 2007). Finalement, des mutations germinales de PTEN sont aussi retrouvées dans des syndromes caractérisés par des désordres de développement, des déficits neurologiques, de multiples hamartomes et une prédisposition pour les cancers du sein, de la glande thyroïde et de l'endomètre (Bononi et al., 2011).

### **1.3.5 La famille des Inhibiteurs d'Apoptose (IAPs)**

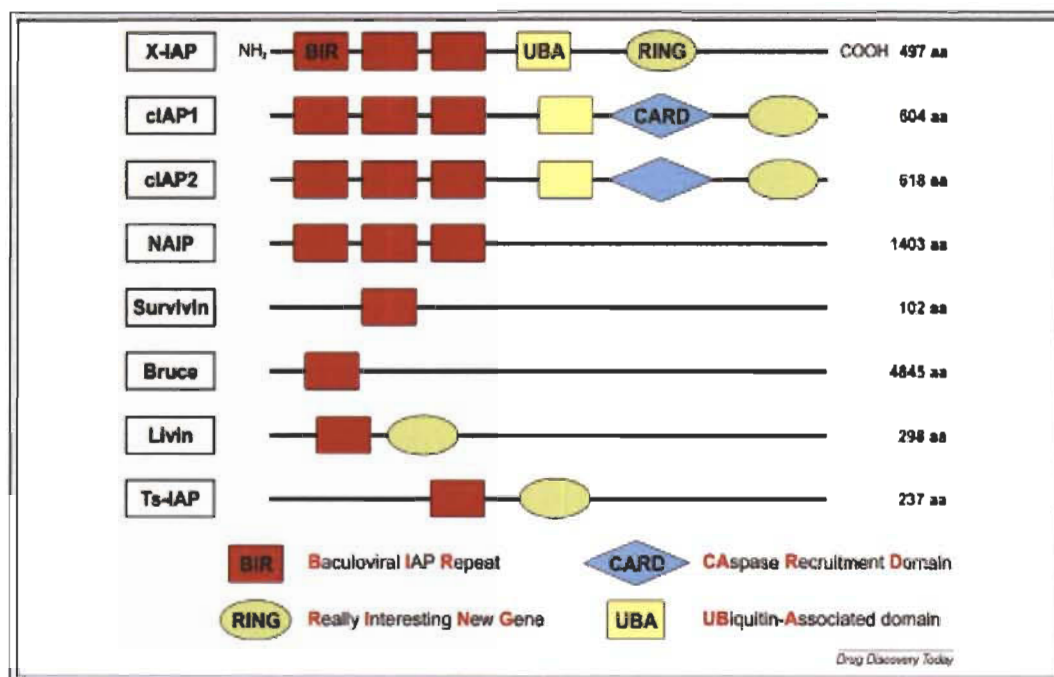
Les IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) constituent une famille de protéines intracellulaires anti-apoptotiques très bien conservées et retrouvées chez la plupart des espèces : les levures, les nématodes, les mouches, les poissons et chez les mammifères (Dubrez-Daloz et al., 2008). Cette famille compte jusqu'à ce jour huit membres dont XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein), cIAP-1 (cellular inhibitor of apoptosis protein 1), cIAP-2 (cellular inhibitor of apoptosis protein 2) ainsi que NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein), ILP2 (IAP-like protein 2), Survivin, Bruce et Livin

(Dubrez-Daloz et al., 2008; Liston et al., 1996; Hauser et al., 1998; Kasof and Gomes, 2001; Richter et al., 2001; Ambrosini et al., 1997). Dans les sections suivantes, seulement les IAPs en lien direct avec les deux volets de cette thèse seront présentées c'est-à-dire XIAP, c-IAP-1 et c-IAP-2.

### ***1.3.5.1 Structure des protéins IAPs***

La taille des protéines IAPs varie considérablement entre elles : de 102 acides aminés (Survivin) à 4845 (Bruce) (Mannhold et al., 2010). La présence d'au moins un domaine BIR (baculoviral IAP repeat), domaine hautement conservé de 70-80 acides aminés, est la caractéristique structurelle qui définit la famille des IAPs (Figure 1.8) (Mace et al., 2010). Les IAPs possèdent entre un et trois domaines BIRs. Le ou les domaines BIRs sont toujours situés dans la région N-terminale de la protéine. Ils sont indispensables à l'activité anti-apoptotique des IAPs par leur capacité de se lier à plusieurs protéines et d'inhiber directement les caspases (Mace et al., 2010; Riedl and Shi, 2004; Vaux and Silke, 2005). Du côté C-terminal, un domaine Ring (really interesting new gene) impliqué dans l'interaction protéine-protéine et protéine-acide nucléique, un domaine de recrutement des caspases (CARD, caspase recruitment domain) et un domaine UBA (ubiquitin-associated) pour lier les protéines ubiquitinées, peuvent aussi être retrouvés (Mace et al., 2010; Mannhold et al., 2010).

XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 possèdent trois domaines BIR (BIR1, BIR2 et BIR3). Structurellement très proche de XIAP, les cIAP-1 et cIAP-2 se distinguent de ce dernier par la présence d'un domaine de recrutement de caspases. Il a été démontré que le domaine Ring des IAPs possède une activité E3 ligase qui est responsable de la polyubiquitination et de la dégradation protéosomale des protéines qui interagissent directement avec les IAPs telles que les caspases mais aussi de plusieurs autres substrats dont elles-mêmes (Schile et al., 2008; Yang et al., 2000; Galban and Duckett, 2010).



**Figure 1.8 : Les membres de la famille des IAPs.**

Tiré de Mannhold R et al., "IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy", *Drug Discovery Today*, March 2010, 15 (5/6) 210-219

### 1.3.5.2 XIAP

La protéine XIAP est exprimée ubiquitairement dans le cytoplasme des cellules (Farahani et al., 1997) et son expression est régulée par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Stehlik et al., 1998). XIAP est considéré comme étant la seule protéine inhibitrice d'apoptose (IAP) qui agit comme un inhibiteur compétitif de l'activité enzymatique des caspases en se liant directement sur leurs sites catalytiques (Eckelman et al., 2006; Galban and Duckett, 2010). XIAP exerce sa capacité de se lier à la caspase initiateur -9 afin d'inhiber la voie de Bax/cytochrome c via son domaine BIR3 (Sun et al., 2000) et d'inhiber les caspases exécutrices -3 et -7 via son domaine BIR2 (Takahashi et al., 1998). XIAP peut être elle-même clivée par les caspases en deux fragments séparant les domaines BIR2 et BIR3 qui toutefois demeurent capables d'inhiber l'activité des caspases (Deveraux et al., 1999). XIAP pourrait aussi réguler l'activité des caspases en participant à la mono et poly-ubiquitination des caspases conduisant à leur dégradation protéosomique par sa fonction E3 ligase (Galban and Duckett, 2010; Schile et al., 2008; Yang et al., 2000; Eckelman et al., 2006). Récemment, il a été démontré que XIAP

pouvait aussi réguler l'ubiquitination et la dégradation de PTEN ainsi que sa localisation nucléaire via son activité E3 ligase (Van Themsche et al., 2009). La phosphorylation de la sérine<sup>87</sup> de XIAP par Akt protégerait XIAP de la dégradation induite par son ubiquitination et même par son auto-ubiquitination (Dan et al., 2004). Finalement, XIAP est impliquée dans l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, qui induit l'expression de plusieurs gènes anti-apoptotiques par son interaction avec TAK1 (TGF $\beta$ -activated kinase 1) via son domaine BIR1 (Jin et al., 2009; Lu et al., 2007). L'implication de XIAP dans la voie de NF- $\kappa$ B favoriserait aussi l'invasion cellulaire et la formation de métastases (Mehrotra et al., 2010; Plati et al., 2011).

### ***1.3.5.3 cIAP-1 et cIAP-2***

cIAP-1 est principalement retrouvée au niveau du noyau tandis que cIAP-2 est exprimée dans le cytoplasme et dans la région périnucléaire (Samuel et al., 2005). cIAP-1 et cIAP-2 sont structurellement très semblables de XIAP. Cependant, même si elles sont aptes à se lier aux caspases -3, -7 et -9 via leurs domaines BIR2 et BIR3, elles sont toutefois incapables de les inhiber directement (Eckelman et al., 2006; Eckelman and Salvesen, 2006; Plati et al., 2011). cIAP-1 et cIAP-2 possèdent aussi une importante activité E3 ligase. cIAP-2 serait impliquée dans l'ubiquitination des caspases-3 et -7 tandis que cIAP-1 serait nécessaire pour lier XIAP afin de promouvoir sa dégradation (Silke et al., 2005; Wei et al., 2008). Elles peuvent aussi se lier à TRAF1 et TRAF2 (TNF- $\alpha$ -associated factors 1 and 2) afin de contrecarrer l'effet apoptotique du TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) en empêchant le recrutement de la caspase-8 (Rothe et al., 1995; Plati et al., 2011). Bien que leurs expressions soient régulées par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, cIAP1 et cIAP-2 sont aussi impliquées dans la régulation de la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B en collaboration avec XIAP (Jin et al., 2009; Plati et al., 2011; Gyrd-Hansen and Meier, 2010). Aussi, cIAP-1 et cIAP-2 sont fréquemment surexprimées dans plusieurs cancers (Gyrd-Hansen and Meier, 2010; Dai et al., 2003; Imoto et al., 2001).

#### ***1.3.5.4 Les antagonistes des IAPs***

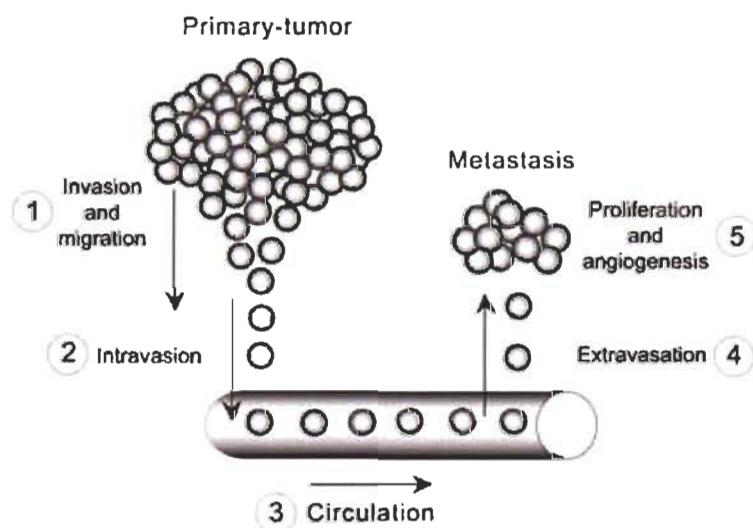
Les antagonistes des IAPs bloquent l'activité des protéines inhibitrices d'apoptose en se fixant à leur domaine BIR, les empêchant ainsi de se lier aux caspases et de les inhiber. Les antagonistes des IAPs possèdent en commun un domaine IBM (IAP-binding motif) qui consiste en un résidu alanine non-modifié dans un motif AKPF du côté N-terminal de la protéine (Vaux and Silke, 2005). Chez les mammifères, ce motif est retrouvé chez Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspases / direct IAP binding protein with a low pI) (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000), HtrA2/Omi (Suzuki et al., 2001; Hegde et al., 2002; Martins et al., 2002; Verhagen et al., 2002) et GSPT1/eRF3 (G<sub>1</sub> to S phase transition protein 1) (Hegde et al., 2003). Smac/DIABLO et HtrA2/Omi sont des protéines localisées dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie et relâchées dans le cytosol lors du processus apoptotique tandis que GSPT1/eRF3 est une protéine associée au réticulum endoplasmique (Hegde et al., 2002). Ces trois antagonistes peuvent potentialiser l'activation des caspases soit en empêchant la liaison des caspases et des IAPs, soit en dissociant les complexes IAP-caspase ou en stimulant l'ubiquitination des IAPs (Hegde et al., 2002). Il a été démontré que les caspases- 3, -7 et -9 possédaient aussi un domaine IBM ou «IBM-like» afin de se lier à XIAP entrant ainsi en compétition directe avec les antagonistes des IAPs (Srinivasula et al., 2001; Scott et al., 2005).

XAF1 (XIAP-associated factor 1) est exprimé constitutivement dans les cellules normales et a été initialement identifié comme étant un facteur de liaison à XIAP (Liston et al., 2001; Tu et al., 2010). En fait, XAF1 interagit directement avec XIAP endogène et le séquestre dans des inclusions nucléaires favorisant l'activation de la cascade des caspases. XAF1 antagonise l'inhibition de la caspase-3 par XIAP (Liston et al., 2001; Tu et al., 2010). Finalement, XAF1 est peu ou pas exprimé dans la plupart des cellules/lignées cancéreuses (Fong et al., 2000): la perte de XAF1 corrèle fortement avec la progression tumorale (Tu et al., 2010; Ma et al., 2005; Byun et al., 2003; Zou et al., 2006; Chung et al., 2007).

## 1.4 Invasion cellulaire et métastase

### 1.4.1 Généralités

L'invasion et la métastase sont les aspects les plus critiques et insidieux d'un cancer (Kohn and Liotta, 1995; Liotta and Stetler-Stevenson, 1991; Kohn, 2006) : les métastases sont responsables de plus de 90 % des décès causés par les cancers (Mehlen and Puisieux, 2006; Weigelt et al., 2005). L'invasivité, c'est la capacité que développent les cellules cancéreuses d'envahir activement les tissus sains adjacents à la tumeur et même parfois de les détruire (Leber and Efferth, 2009). La métastase, quant à elle, fait plutôt référence à la capacité que développent les cellules cancéreuses de quitter la tumeur primaire et de voyager via la circulation sanguine vers un autre site tissulaire situé à distance afin de le coloniser et de former une tumeur secondaire (Leber and Efferth, 2009). Brièvement, la métastase se déroule en 5 étapes (Figure 1.9) (Leber and Efferth, 2009) :



**Figure 1.9 : Les 5 étapes de la cascade métastatique.**

Tiré de Leber and Efferth, "Molecular principles of cancer invasion and metastasis", *International Journal of Oncology* (2009) 34, 881-895



- 1) L'invasion et la migration : des cellules cancéreuses se détachent de la tumeur primaire et envahissent les tissus sains adjacents en sécrétant des enzymes protéolytiques qui dégradent la matrice extracellulaire (ECM), ce qui facilite la migration.
- 2) L'intravasation : les cellules cancéreuses s'attachent aux cellules endothéliales via des molécules d'adhésion puis sécrètent des enzymes protéolytiques afin de s'infiltrer dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques.
- 3) La circulation : les cellules cancéreuses voyagent dans la circulation sanguine où elles sont confrontées à la toxicité de l'oxygène et aux lymphocytes cytotoxiques, sélectionnant ainsi les cellules cancéreuses particulièrement résistantes et agressives.
- 4) L'extravasation : les cellules cancéreuses s'accumulent dans les petits capillaires sanguins d'un organe et quittent la circulation sanguine en pénétrant l'endothélium via des enzymes protéolytiques.
- 5) La colonisation : les cellules cancéreuses s'installent, prolifèrent dans un nouveau site tissulaire puis induisent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins afin de bien vasculariser la nouvelle tumeur.

Plusieurs évidences démontrent que le phénotype métastatique est préexistant dans une tumeur et que la micro-invasion locale survient très tôt dans le processus bien avant que la dissémination des cellules cancéreuses soit débutée ou évidente (Ramaswamy et al., 2003; Wang et al., 2005; Roepman et al., 2005; Kohn, 2006). Le potentiel métastatique d'un cancer est influencé par le microenvironnement local de la tumeur c'est-à-dire par les composantes de la matrice extracellulaire, par la présence des intégrines, des cadhérines et des molécules d'adhésion cellule-cellule (CAM) et cytokines produites par le tissu, par les interactions stroma-tumeur, par les facteurs de la motilité cellulaire et du chimiotactisme, par l'expression des gènes de la métastase et des suppresseurs de métastases ainsi que par l'activation des métalloprotéinases et leurs

inhibiteurs, activateurs du plasminogène et autres (Liotta and Kohn, 2001; Leber and Efferth, 2009). De plus, la nature et la localisation de la tumeur primaire aussi bien que les facteurs angiogéniques peuvent être considérés comme des facteurs métastatiques (Leber and Efferth, 2009). Alors que des millions de cellules cancéreuses pénètrent dans la circulation sanguine chaque jour, en provenance d'une tumeur invasive, seulement une petite fraction (0,01 %) va réussir à établir une colonie (Kohn and Liotta, 1995; Woodhouse et al., 1997; Fidler and Hart, 1982; Kohn, 2006).

Étant donné la complexité du processus métastatique, seulement les métalloprotéinases et leurs inhibiteurs en lien avec notre étude seront abordés dans cette section.

## **1.4.2 Les métalloprotéinases matricielles (MMPs)**

### ***1.4.2.1 Généralités***

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs) ou matricines sont des endopeptidases zinc-dépendantes connues pour leurs capacités à dégrader une ou plusieurs composantes de la matrice extracellulaire (Massova et al., 1998), d'activer certains facteurs de croissances et de cliver des protéines de la surface membranaire (récepteurs de cytokines, molécules d'adhésion cellulaire, etc.) (Kessenbrock et al., 2010; Klein and Bischoff, 2011; Cauwe et al., 2007; Rodriguez et al., 2010; Bauvois, 2011). Découvertes en 1962 par Gross et Lapière (Gross and Lapiere, 1962), les métalloprotéinases sont une large famille de protéases qui sont impliquées dans des processus physiologiques normaux tels que le développement embryonnaire, l'involution de l'utérus post-partum, le remodelage cartilagineux et osseux, l'ovulation et la cicatrisation mais aussi dans des processus pathologiques comme l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoarthrite et le cancer (Birkedal-Hansen, 1988; Emonard and Grimaud, 1990; Woessner, Jr., 1991). L'activité protéolytique des MMPs leur permet de jouer un rôle crucial dans l'invasion et la métastase ainsi que de réguler les voies de signalisation qui contrôlent la croissance et la survie cellulaire, l'invasion, l'inflammation et l'angiogénèse (Bauvois, 2011). La

plupart des MMPs ne sont pas exprimées constitutivement ou leurs activités sont négligeables. Elles sont induites par des cytokines, des hormones, des facteurs de croissance ainsi que par les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice (Polette et al., 2004; Nagase et al., 2006). De plus, l'activité des MMPs est inhibée par des antagonistes endogènes, les TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) (Nguyen et al., 2001).

Finalement, les MMPs présentent plusieurs propriétés structurales et fonctionnelles communes mais cependant elles diffèrent dans leurs spécificités de substrats et sont subdivisées en plusieurs groupes : les collagénases, les gélatinases, les stromélysines, les matrilysines, les MT-MMPs et les autres inclassables.

#### ***1.4.2.2 Structure et activation des MMPs***

En général, les MMPs sont organisées en quatre sections : a) un domaine N-terminal de 80 à 90 acides aminés qui agit à titre de pro-peptide et contenant le motif «cysteine switch» PRCGXPD, b) un domaine métalloprotéinase catalytique d'environ 170 acides aminés contenant trois résidus histidines, des ions zinc dans un motif HEXXHXXGXXH, c) une région charnière flexible de longueur variable et parfois absente ainsi d) qu'un domaine hémapexine d'environ 200 acides aminés du côté C-terminal qui est nécessaire pour la fixation du substrat (Figure 1.10) (Massova et al., 1998; Nagase et al., 2006; Bauvois, 2011; Kessenbrock et al., 2010; Klein and Bischoff, 2011). De plus, les gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9) possèdent dans leur domaine métalloprotéinase trois répétitions d'un motif fibronectine de type II (Nagase et al., 2006; Polette et al., 2004). La MMP-9 possède aussi un domaine unique de type collagène V (Polette et al., 2004). Les MT-MMPs (membrane-anchored MMPs) possèdent, quant à elles, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique ou un domaine d'ancrage glycoposphatidylinositolique (Polette et al., 2004).

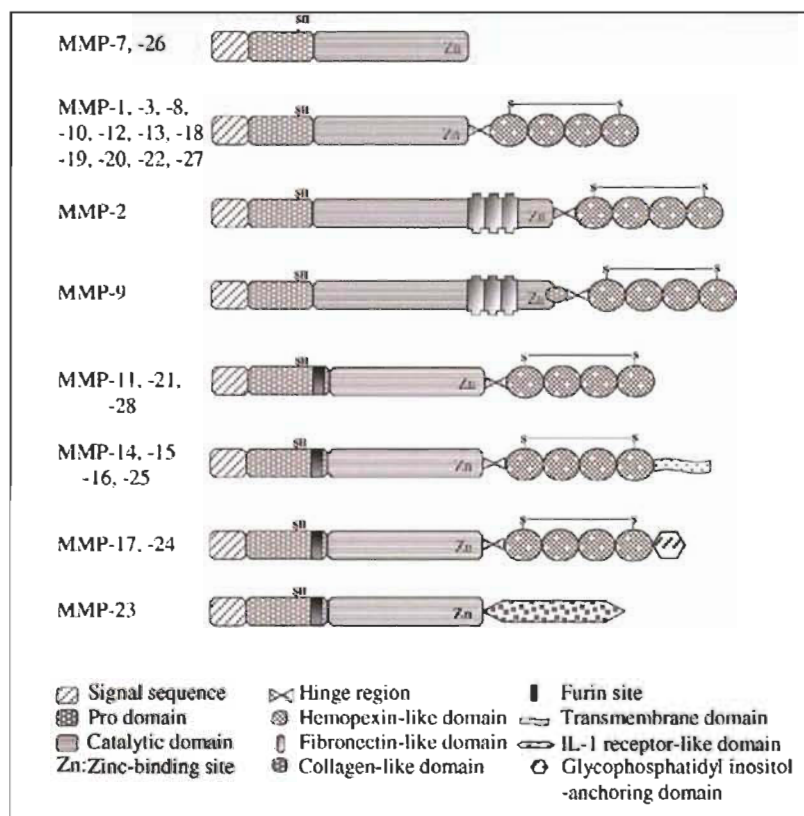
Les MMPs sont synthétisées sous forme de pré-proenzymes : le peptide signal est retiré lors de la traduction générant une pro-enzyme (zymogène, pro-MMP) inactive. Les

trois histidines et le zinc du domaine métalloprotéinase ainsi que les cystéines du pro-peptide se lient afin de former un complexe Cys-Zn<sup>2+</sup> qui maintient les pro-MMPs inactives en empêchant une molécule d'eau de se lier au zinc (Nagase et al., 2006; Van Wart and Birkedal-Hansen, 1990). L'activation des pro-MMPs par clivage catalytique de leur pro-domaine est une importante étape dans la régulation de leurs activités (Massova et al., 1998).

Aussi, les pro-MMPs peuvent être clivées/activées par des MMPs intermédiaires ou actives ainsi que par d'autres protéinases d'origine tissulaires, plasmatiques ou bactériennes (Nagase et al., 2006; Nagase et al., 1990). Pendant l'activation, l'interaction Cys-Zn<sup>2+</sup> est rompue permettant l'hydrolyse du pro-domaine (Nagase et al., 1990; Nagase et al., 2006). Finalement, certaines MMPs possèdent une séquence de reconnaissance de l'enzyme de conversion pour la furine dans leur pro-peptide qui active intracellulairement les MMPs au niveau de l'appareil de Golgi avant d'être sécrétées ou ancrées à la surface cellulaire (Nagase et al., 2006; Remacle et al., 2003; Wang et al., 2004). L'activité de ces MMPs est alors régulée selon la localisation spécifique de l'enzyme dans le tissu et par la présence d'inhibiteurs endogènes.

#### ***1.4.2.3 Les MMP-2, MMP-9 et la MMP-14***

Le groupe des collagénases de type IV ou gélatinases, inclut la gélatinase A (MMP-2) et la gélatinase B (MMP-9). Les gélatinases possèdent un motif fibronectine qui leur permettent de se fixer à la gélatine (collagène dénaturé) et au collagène (Polette et al., 2004). Elles peuvent dégrader d'autres molécules de la matrice extracellulaire incluant les collagènes de type IV, V et XI ainsi que la laminine. La MMP-2 peut dégrader les collagènes de types I, II et III comme les collagénases alors que la MMP-9 en est incapable (Aimes and Quigley, 1995; Patterson et al., 2001; Nagase et al., 2006; Polette et al., 2004). Les gélatinases sont sécrétées sous la forme inactive pro-MMP-2 (72 kDa) et la pro-MMP-9 (92 kDa). Elles sont activées par le clivage de leur pro-peptides en MMP-2 (65 kDa) et MMP-9 (82 kDa) (Bauvois, 2011).



**Figure 1.10 : Structure des MMPs.**

Tiré de Polette, Nawrocki-Raby et al., "Tumour invasion and matrix metalloproteinases", Critical Reviews in Oncology/Hematology (2004) 49, 179-186

La MMP-14 fait partie du groupe des MT-MMPs (Nawrocki-Raby et al., 2001). La MMP-14 est ancrée à la surface de la cellule via un domaine transmembranaire. La MMP-14 possède une activité collagénase qui dégrade les collagènes de types I, II et III bien que cela ne soit pas sa fonction principale (Ohuchi et al., 1997; Murphy and Nagase, 2008). La MMP-14 active principalement la pro-MMP-2 qui forme un complexe avec le TIMP-2 (Bauvois, 2011; Cauwe et al., 2007). La pro-MMP-2 peut aussi être activée par d'autres MMPs ainsi que par la thrombine et une protéine C activée (Bauvois, 2011). Quant à elle, la pro-MMP-9 est activée entre autre par la plasmine, la trypsine-2 et la MMP-2 (Bauvois, 2011).

#### ***1.4.2.4 Les MMPs et le cancer***

De toutes les MMPs possiblement impliquées dans le cancer, les gélatinases retiennent l'attention parce qu'elles sont surexprimées dans une grande variété de tumeurs malignes et que leurs expressions et/ou activités sont souvent associées avec l'agressivité tumorale et à un pronostic difficile (Bauvois, 2011). Tandis que la MMP-2 est largement exprimée dans les tissus normaux et cancéreux, la MMP-9 est induite sous certaines conditions (remodelage & réparation tissulaire, tumeurs) et son inhibiteur, le TIMP-1 est exprimé constitutivement (Polette et al., 2004). L'équipe de Soini et al. (Soini et al., 1997), a démontré que les MMP-2 et MMP-9 étaient surexprimées dans les hyperplasies endométriaux ainsi que dans les cancers de l'endomètre et que cette surexpression était liée au grade histologique et à l'invasion du myomètre (Takemura et al., 1992). Une surexpression de MMP-2 et MMP-9 est aussi retrouvée dans les cancers du sein (Somari et al., 2006), du cerveau (Forsyth et al., 1999), des ovaires (Maatta et al., 2007), du pancréas (Tian et al., 2008; Yokoyama et al., 2002), du côlon (Murnane et al., 2009), de la vessie (Sier et al., 2000), de la prostate (Wood et al., 1997), des poumons (Nawrocki et al., 1997), de la peau (Pyke et al., 1992) ainsi que dans les leucémies et lymphomes Hodgkiniens et non-Hodgkiniens (Yu and Han, 2006; Klein et al., 2004) (Bauvois, 2011; Klein and Bischoff, 2011; Roy et al., 2009).

Il a été démontré que la MMP-2 et son activateur, la MMP-14, pouvaient sélectivement clivées la chaîne  $\gamma 2$  de la lamine 5 ayant pour effet de stimuler la migration cellulaire in vitro (Giannelli et al., 1997; Gilles et al., 2001; Koshikawa et al., 2000; Polette et al., 2004). Il a également été établi que la suppression de l'activité de la MMP-2 diminuait la croissance tumorale de 70 % (Fang et al., 2000). Ainsi, la surexpression de la MMP-2 jumelée à la suppression de son inhibiteur, le TIMP-2 sont donc des indicateurs de la présence d'un cancer à fort potentiel invasif. L'expression de la MMP-9 quant à elle augmenterait durant la progression de l'invasion tumorale et favoriserait, en collaboration avec la MMP-2, l'invasion des tissus lymphatiques et vasculaires avoisinants (Aglund et al., 2004). De plus, les deux gélatinases seraient impliquées dans la formation de vaisseaux sanguins nécessaires à la croissance tumorale et à la dispersion des métastases.

Des études avec des souris «knock-out» pour les MMP-2 et MMP-9 ont démontré que les gélatinases ne favorisent pas l'invasion des membranes basales par leurs capacités à dégrader le collagène de type IV telle qu'initialement suggérée. Ces études démontrent que les gélatinases jouent un rôle majeur mais indirecte en contrôlant plutôt la biodisponibilité et l'activité des molécules impliquées dans la régulation de la croissance cellulaire, la migration, l'inflammation et l'angiogénèse (Baluk et al., 2004; Hotary et al., 2006; Sabeh et al., 2009; Bauvois, 2011; Klein and Bischoff, 2011).

### **1.4.3 Les inhibiteurs des MMPs**

Les MMPs sont régulées principalement par deux types d'inhibiteurs endogènes : les  $\alpha$  2-macroglobulines ( $\alpha$ 2M) et les TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases). Les  $\alpha$  2-macroglobulines sont des glycoprotéines retrouvées dans le plasma sanguin et dans les autres fluides tissulaires qui agissent comme transporteurs et inhibiteurs de protéases (Barrett and Starkey, 1973). Concrètement, les MMPs sont piégées à l'intérieur de la  $\alpha$ 2M et le complexe ainsi formé est rapidement éliminé par endocytose par la LRP 1 (Low density lipoprotein receptor-related protein 1) (Strickland et al., 1990).

Les TIMPs sont au nombre de quatre : TIMP-1 à TIMP-4. Ils ont été initialement identifiés comme des inhibiteurs de collagénases (Vatier et al., 1979) mais sont connus aujourd'hui pour être aptes à inhiber toutes les MMPs. Cependant, le TIMP-1 a peu d'affinité pour la MMP-14 (MT-MMPs) mais inhibe la MMP-9 (Baker et al., 2002; Murphy and Nagase, 2008) alors que le TIMP-2 interagit plus particulièrement avec les MMP-14 et MMP-2 (Noda et al., 2003). Les quatre TIMPs sont très homologues les uns aux autres et sont constitués de 184 à 194 acides aminés dont douze résidus cystéines bien conservés (Williamson et al., 1990; Murphy and Nagase, 2008). Ils sont divisés en deux domaines, C-terminal et N-terminal, contenant des ponts disulfures. Le domaine N-terminal seul est suffisant pour l'inhibition des MMPs (Murphy et al., 1991; Murphy and Nagase, 2008). Finalement, d'autres protéines capables d'inhiber plus spécifiquement certaines MMPs ont été rapportées mais leurs mécanismes d'inhibition ne sont pas encore clarifiés.

## 1.5 Les prostaglandines et les cyclooxygénases

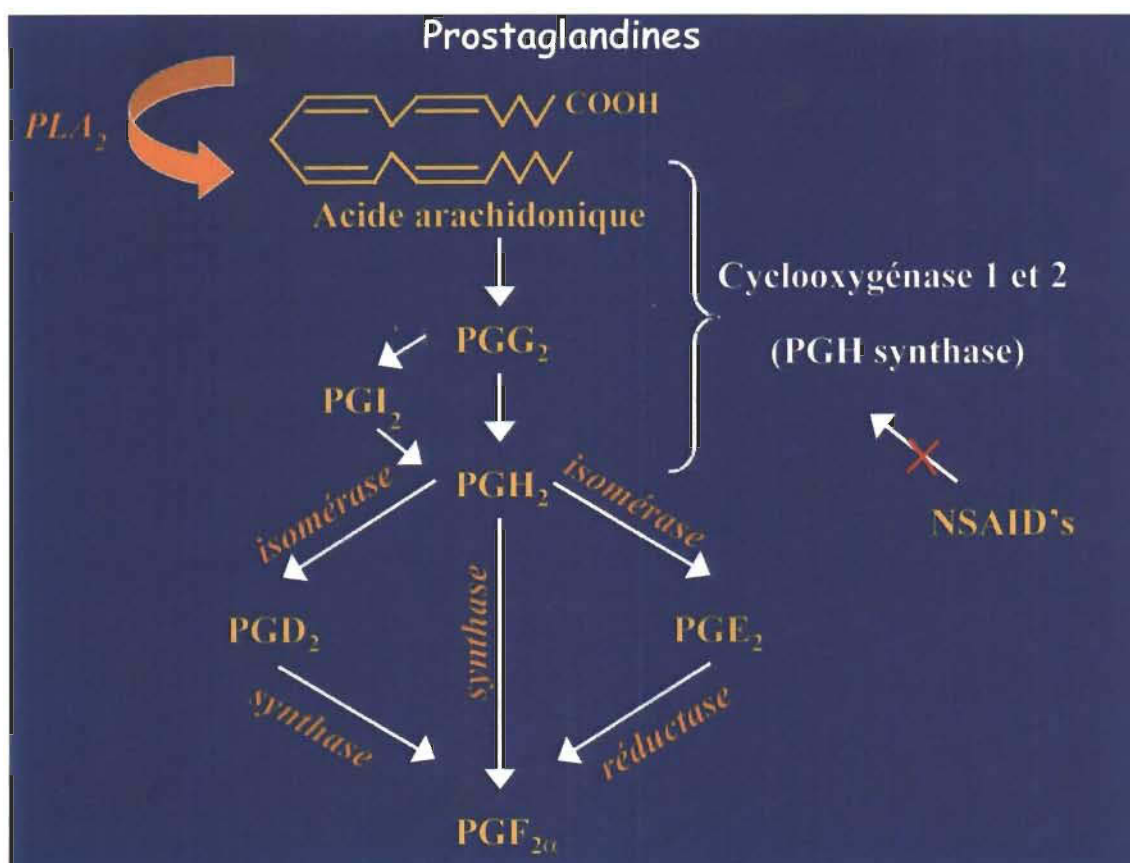
### 1.5.1 Généralités

En 1863, Rudolf Virchow émettait l'hypothèse de l'existence d'un lien entre l'inflammation et le cancer suite à l'observation de la présence de leucocytes dans des tissus néoplasiques (Hussain and Harris, 2007; Balkwill and Mantovani, 2001). Il est maintenant bien connu que ce lien implique des médiateurs du processus inflammatoire et des cytokines qui, en addition avec les altérations génétiques, agissent sur le développement et le microenvironnement tumoral (Sobolewski et al., 2010). Les prostaglandines (PGs) sont des métabolites lipidiques inflammatoires dérivées de l'acide arachidonique via les cyclooxygénases (COXs). Les prostaglandines se fixent sur des récepteurs spécifiques qui activent des voies de signalisation fortement impliquées dans la carcinogénèse (Wang et al., 2011).

### 1.5.2 Les prostaglandines (PGs)

Les prostaglandines sont des lipides biologiquement très actives qui ont été isolées pour la première fois en 1936 dans le plasma séminal humain (von Euler, 1936). Elles font partie de la classe des prostanoïdes, sous-classe des éicosanoïdes, qui comprend aussi les thromboxanes et les leucotriènes. Les cyclooxygénases (COXs) sont les enzymes qui convertissent l'acide arachidonique, provenant de l'hydrolyse des phospholipides membranaires par la phospholipase A<sub>2</sub>, en prostaglandines H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) le précurseur de tous les prostanoïdes : de la PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> et de la thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) (Figure 1.11) (Smith et al., 1996). La PGH<sub>2</sub> est convertie en prostaglandines sous l'action de diverses enzymes dont l'isomérase endopéroxydase E pour la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) ainsi que la réductase endopéroxydase H et/ou la prostaglandine F synthase pour la PGF<sub>2α</sub> (Rishikesk and Sadhana, 2003; Jabbour and Sales, 2004). La PGE<sub>2</sub> peut aussi être convertie en PGF<sub>2α</sub> via la PGE<sub>2</sub> 9-kétoréductase. Les prostaglandines sont produites en réponse à une stimulation hormonale; elles ne sont pas stockées à l'intérieur des cellules. Leurs actions autocrines et paracrines s'exercent via des récepteurs couplés à la protéine G (GPCR family).





**Figure 1.11 : Schématisation de la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines par les cyclooxygénases.**

Tiré de la thèse du Dr Eric Asselin, 1998

Les prostaglandines sont présentes dans une grande variété de tissus et jouent un rôle important dans une multitude de processus physiologiques et pathologiques. Elles sont essentielles au maintien de l'homéostasie dans la coagulation sanguine (Philipose et al., 2010), la reproduction et la gestation (Slater et al., 2002; Asselin et al., 1996), la protection de la muqueuse gastrique (Takeuchi et al., 2010), le métabolisme osseux (Sabbieti et al., 2010), la fonction rénale (Rios et al., 2011) et la réponse immunitaire (Dubois et al., 1998; Harizi et al., 2008). Elles sont aussi impliquées dans l'inflammation (Harizi et al., 2008), dans des désordres cardio-vasculaires (Archart et al., 2007) et le cancer (Greene et al., 2011).

### 1.5.3 Les cyclooxygénases COX-1 et COX-2

Les cyclooxygénases COX-1 et COX-2 sont des enzymes qui catalysent la conversion de l'acide arachidonique en prostanoïdes. Malgré leur similarité dans leur structure et leur propriété catalytique, COX-1 et COX-2 sont codés par des gènes différents : chromosome 9 pour COX-1 (22 kb) et chromosome 1 pour COX-2 (8,3 kb)(Kang et al., 2007). COX-1 est reconnue pour être exprimée constitutivement et stablement dans la plupart des cellules et être impliquée dans le maintien de la muqueuse gastrique (Trevethick et al., 1995), la vasodilatation dans les reins (Palmer and Henrich, 1995; Zambraski, 1995) ainsi que dans le contrôle de l'agrégation plaquettaire (Schafer, 1995). Toutefois, il a été démontré que COX-1 pouvait aussi être surexprimée dans certains carcinomes (Sales et al., 2002; Hwang et al., 1998; Kirschenbaum et al., 2000) et jouer un rôle dans la tumorigénicité (Jabbour and Sales, 2004).

L'expression de COX-2, qui est impliquée dans les processus inflammatoires, est reconnue pour être induite en réponse à des substances mitogènes, des cytokines, des facteurs de croissance et des promoteurs tumoraux (Herschman, 1996; Smith et al., 2000; Tanabe and Tohnai, 2002). Cependant, COX-2 est exprimée constitutivement dans certains tissus dont les poumons (Asano et al., 1996), le cerveau (Kaufmann et al., 1997), les reins (Harris and Breyer, 2001), les cellules  $\beta$  du pancréas (Robertson, 1998) et dans une grande variété de cancers (Ohno et al., 2005). Les cellules exprimant la COX-2 synthétisent et relâchent dans le milieu extracellulaire principalement de la PGE<sub>2</sub>. COX-2 favorise la survie et la prolifération cellulaire via l'activation de la voie de signalisation PI 3K/AKT et/ou de NF- $\kappa$ B (Poligone and Baldwin, 2001). Cette activation est probablement dû à un effet autocrine et paracrine de la PGE<sub>2</sub> car ces deux voies ont aussi démontré leur capacité à réguler l'expression de COX-2 (Poligone and Baldwin, 2001; St Germain et al., 2004b; St Germain et al., 2004a).

Une troisième isoforme des COXs a été récemment identifiée, il s'agit de COX-3 une variante de la COX-1 qui est abondamment exprimée au niveau du cortex cérébral et du cœur, toutefois son rôle physiologique n'est pas encore clairement établi (Chandrasekharan et al., 2002).

### 1.5.4 Les récepteurs des prostaglandines

Après leur synthèse, les prostaglandines sont rapidement exportées à l'extérieur de la cellule, via un transporteur de prostaglandines (PGT) transmembranaire. Elles exercent leurs actions biologiques selon un mode autocrine et/ou paracrine sur les récepteurs transmembranaires de types GPCRs. Ainsi, la  $\text{PGE}_2$  peut se lier aux récepteurs prostanoides EP, la  $\text{PGD}_2$  aux récepteurs DP, la  $\text{PGF}_{2\alpha}$  aux récepteurs FP, la  $\text{PGI}_2$  aux récepteurs IP et la  $\text{TxA}_2$  aux récepteurs TP (Coleman et al., 1994b; Jabbour and Sales, 2004).

La  $\text{PGE}_2$  possède quatre principaux récepteurs qui diffèrent dans leurs actions et réponses:  $\text{EP}_1$ ,  $\text{EP}_2$ ,  $\text{EP}_3$  et  $\text{EP}_4$  (Coleman et al., 1994b; Jabbour and Sales, 2004). L'activation des récepteurs  $\text{EP}_2$  et  $\text{EP}_4$ , couplés aux protéines  $\text{G}\alpha_s$ , entraînent une stimulation de l'adénylate cyclase qui a pour effet d'augmenter la quantité cAMP disponible cependant, le récepteur  $\text{EP}_4$  ne réagit pas aux mêmes drogues/ligands que  $\text{EP}_2$  (Coleman et al., 1994b; Coleman et al., 1994a). Le récepteur  $\text{EP}_1$  qui est couplé à une protéine  $\text{G}\alpha_q$  mobilise le  $\text{Ca}^{2+}$  et entraîne une augmentation du second messager inositol (1,4,5) triphosphate ( $\text{IP}_3$ ). Le récepteur  $\text{EP}_3$  possède quatre formes variantes. Sa forme majeure  $\text{EP}_3\text{A}$  peut se coupler à une protéine  $\text{G}\alpha_i$  et induire une diminution du cAMP tandis que les formes  $\text{EP}_3\text{B}$  et  $\text{EP}_3\text{C}$  sont couplées à une protéine  $\text{G}\alpha_s$ . La forme  $\text{EP}_3\text{D}$  est couplée à une protéine  $\text{G}\alpha_q$  mais peut aussi se coupler en plus aux  $\text{G}\alpha_i$  et  $\text{G}\alpha_s$  (Coleman et al., 1994b; Coleman et al., 1994a). Ainsi, la co-expression de récepteurs ayant des actions opposées, dans un type cellulaire, permet un certain contrôle homéostatique sur l'action autocrine et paracrine de la  $\text{PGE}_2$  qui se retrouve en grande quantité près des sites de synthèses (Ashby, 1998).

### 1.5.5 La relation entre COX-2, les prostaglandines et le cancer

Plusieurs études suggèrent que COX-2 pourrait jouer un rôle important dans le développement et la progression du cancer ainsi que dans la métastase (Figure 1.12) (Dubois et al., 1998; Larkins et al., 2006; Ohno et al., 2005). La surexpression de COX-2 dans les cancers favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui sont

essentiels à la survie des cellules tumorales via la production de PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> et TXA<sub>2</sub> (Ohno et al., 2005). La PGE<sub>2</sub> stimule la production du facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) (Liu et al., 2002), l'expression de la MMP-2 et MMP-9 qui sont aussi impliquées dans l'angiogénèse (Dohadwala et al., 2002) ainsi que l'expression de la protéine Bcl-2 qui soutient la réponse angiogénique (Nor et al., 1999) et bloque le processus apoptotique (Liu et al., 2001). La PGF<sub>2α</sub> favoriserait l'invasion cellulaire suite à l'activation d'une désintégrine/metalloprotéinase ADAMTS1 via la voie de signalisation calmoduline (Keightley et al., 2010). La PGI<sub>2</sub> régule la croissance endothéliale de même que la perméabilité vasculaire (Murohara et al., 1998) tandis que la TXA<sub>2</sub> stimule la motilité des cellules endothéliales (Daniel et al., 1999).

La surexpression de COX-2 peut aussi augmenter l'invasion des cellules cancéreuses et diminuer l'adhésion cellulaire suite à l'activation de la MMP-2 et de la MMP-9 ainsi qu'une diminution de l'expression de la E-cadhérine (Tsuji and Dubois, 1995; Tsujii et al., 1997). Aussi, il est reconnu que COX-2 toujours via la production de la PGE<sub>2</sub> peut avoir un effet immunosuppresseur en inhibant les fonctions des cellules dendritiques (Sharma et al., 2003) et la production de IL-2 (Harris et al., 2002) ainsi qu'en limitant la production d'interférons  $\gamma$  (Wu et al., 1998). La PGE<sub>2</sub> diminuerait également la prolifération et l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (DeLong et al., 2003; Kojima et al., 2001). L'équipe de Oshima et al., (Oshima et al., 1996) a démontré lors d'une étude sur des souris déficientes en COX-2 une réduction de 86 % de la fréquence des adénomes intestinales ainsi qu'une réduction de 66 % chez les souris hétérozygotes pour cette même enzyme. Aussi, une étude de Liu et al., (Liu et al., 2001) démontre que la surexpression de COX-2 est suffisante pour induire la tumorigénicité des glandes mammaires de souris transgéniques. Tous ces résultats suggèrent que l'expression de COX-2 contribuerait d'une façon significative au développement du cancer.

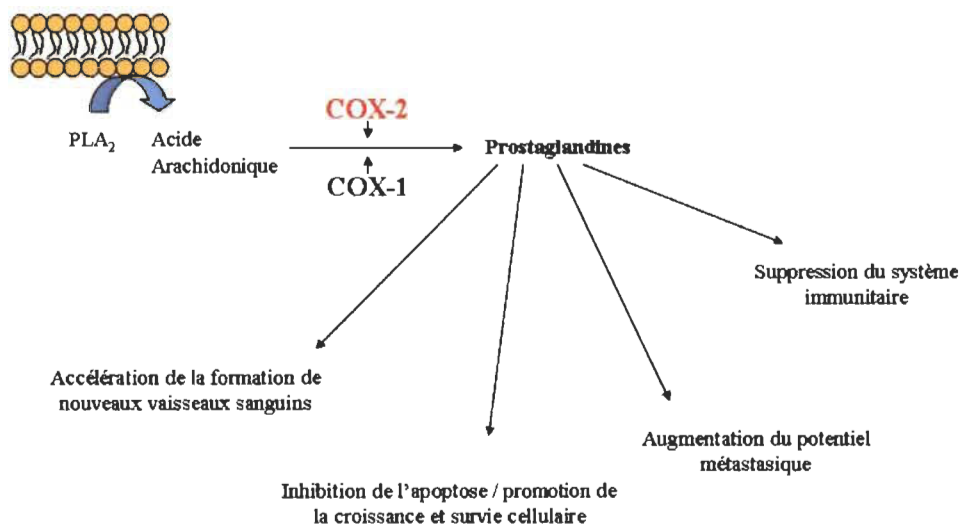


Figure 1.12 : **Le rôle de COX-2 dans la progression du cancer.**

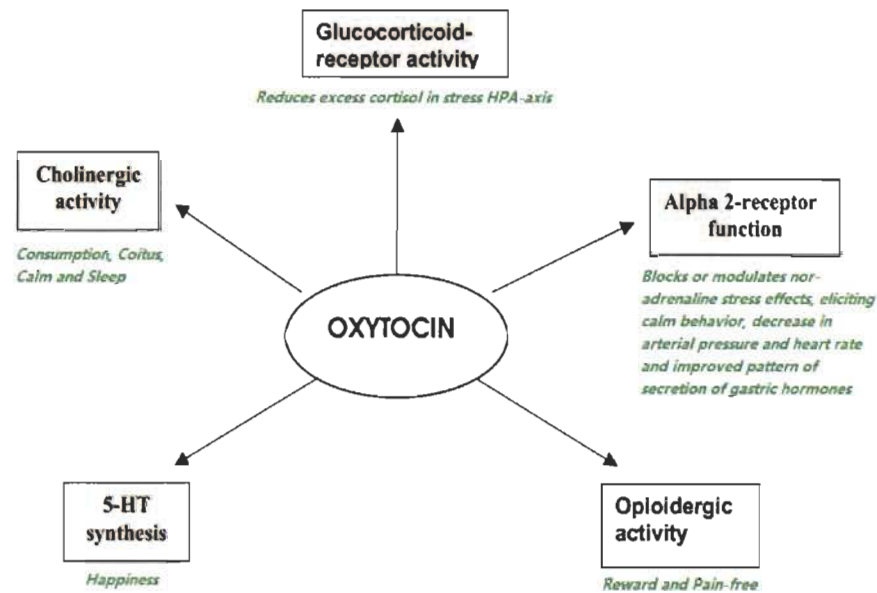
Adapté de Ohno et al., "Multiple roles of cyclooxygenase-2 in endometrial cancer", *Anticancer Res.*, 2005, 25 (6A) : 3679-85

## 1.6 L'ocytocine

### 1.6.1 Structure et fonction de l'ocytocine

L'ocytocine (OT) a été la première hormone dont la structure a été définie et synthétisée chimiquement (DU, V et al., 1953). L'ocytocine est composée de 9 acides aminés (Cys, Tyr, Ile, Gln, Asn, Cys, Pro, Leu et Gly) dont les deux groupements cystéines sont reliés par un pont disulfure (Ivell and Richter, 1984). Elle est abondamment synthétisée par les neurones magnocellulaires des noyaux paraventriculaire et supraoptique de l'hypothalamus puis sécrétée par la neurohypophyse dans la circulation sanguine (Gimpl and Fahrenholz, 2001). D'autres tissus produisent également de l'ocytocine tels que l'utérus (Lefebvre et al., 1992a), le placenta (Lefebvre et al., 1992b), l'amnion et le corpus luteum (Chibbar et al., 1993), les testicules et la prostate (Ivell et al., 1997) ainsi que le cœur (Jankowski et al., 1998). Via son récepteur, l'ocytocine est impliquée dans la régulation de plusieurs processus liés à la reproduction et au comportement (Cassoni et al., 2004) tels que : le contrôle et la longueur du cycle menstruel (Flint et al., 1994), la lutéinisation des follicules ovariens

(Einspanier et al., 1995; Einspanier et al., 1997), la production des stéroïdes ovariens (Chandrasekher and Fortune, 1990), la parturition et l'éjection de lait durant la lactation (Blanks and Thornton, 2003; Kiss and Mikkelsen, 2005) ainsi que le développement du comportement maternel, l'établissement de liens sociaux et autres (Figure 1.13) (Gimpl and Fahrenholz, 2001).



**Figure 1.13 : L'effet de l'ocytocine sur différents systèmes.**

Tiré de [www.richarhill.com.au/oxytocin.pdf](http://www.richarhill.com.au/oxytocin.pdf)

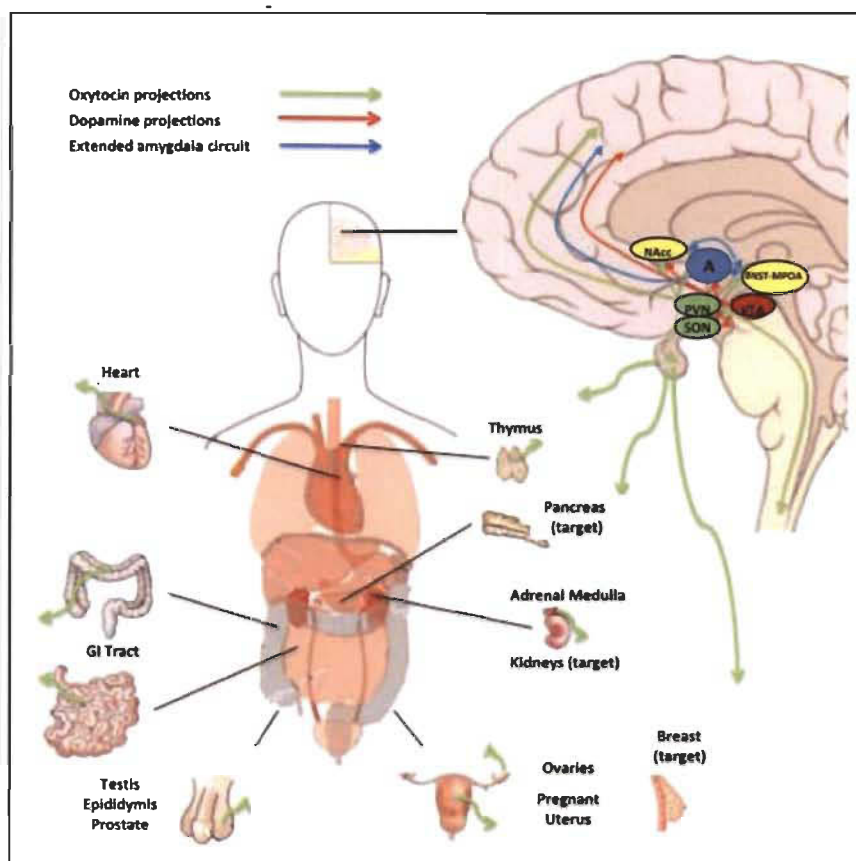
En réponse à l'ocytocine les cellules endométriales ont démontré leur capacité à stimuler la production de prostaglandines utérines via la régulation de la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Asselin et al., 1997). Ainsi la prostaglandine  $\text{PGF}_{2\alpha}$  produite serait responsable de la lutéolyse et le retour au cycle tandis que la  $\text{PGE}_2$  posséderait un effet lutéoprotecteur et favoriserait la perméabilité vasculaire nécessaire à l'implantation d'un embryon (Asselin et al., 1996; Asselin et al., 1997; Poyser, 1995).

### 1.6.2 Le récepteur de l'ocytocine (OTR)

Le récepteur à l'ocytocine (OTR) fait partie de la classique famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR)(Gimpl and Fahrenholz, 2001). Il est exprimé dans une très grande variété de tissus dont : le système nerveux central (Kendrick, 2000), l'endomètre et le myomètre (Fuchs et al., 1985; Takemura et al., 1993), l'ovaire (Khan-Dawood, 1997), le trophoblaste (Takemura et al., 1994), le rein (Conrad et al., 1993), le cœur (Favaretto et al., 1997), le thymus (Geenen et al., 1986), le pancréas (Amico et al., 1988), les cellules endothéliales (Thibonnier et al., 1999), les os (Copland et al., 1999a), dans les adipocytes (Boland and Goren, 1987) ainsi que dans les testicules, la prostate (Ivell et al., 1997) et dans le tissu mammaire (Olins and Bremel, 1984), suggérant que l'ocytocine possède des fonctions physiologiques plus élaborées que celles qui lui sont classiquement attribuées.

La régulation des fonctions de l'ocytocine est dépendante des stéroïdes. Il a été démontré que le  $17\beta$ -oestradiol (E2) stimule l'expression de OTR tandis que la progestérone (P<sub>4</sub>) peut bloquer de façon réversible le récepteur (Gimpl and Fahrenholz, 2001) ou réguler négativement son expression (Amico et al., 2002). Toutefois, il est reconnu que la progestérone potentialise la réponse du récepteur à l'œstrogène (Asselin et al., 1996). Dans l'utérus normalement cyclé, le niveau le plus élevé d'ARNm du récepteur est détecté lors de la phase ovulatoire (jour 14) tandis que la présence du récepteur est signalé durant la phase sécrétoire et ce, dans l'épithélium glandulaire seulement (Kimura, 1998; Takemura et al., 1993). Par contre dans l'utérus gravide, l'ARNm et la protéine de l'OTR sont localisés dans les cellules déciduales et sont retrouvés en quantité beaucoup plus importante (Takemura et al., 1994). Dans les dernières années, le récepteur de l'ocytocine a été identifié dans des tissus du cancer du sein (Cassoni et al., 1994), du cancer de l'endomètre (Cassoni et al., 2000), dans le carcinome ovarien (Morita et al., 2004), dans le neuroblastome et astrocytome (Cassoni et al., 1998a), dans le carcinome pulmonaire à petites cellules ainsi que dans le choriocarcinome (Cassoni et al., 2001b) évoquant un rôle pour l'ocytocine dans le processus cancéreux.

## Brain and Peripheral Sites of OXYTOCIN Release



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21984889> Gordon et al. Dev Cogn Neurosci 2011.

**Figure 1.14 : Les sites de production d'ocytocine et les organes cibles.**

Plusieurs études rapportent que l'ocytocine peut parfois inhiber, stimuler ou n'avoir aucun effet sur la prolifération/migration cellulaire et ce, selon le type de tissu (Cassoni et al., 1994; Cassoni et al., 1997; Cassoni et al., 1998a; Cassoni et al., 1998b; Cassoni et al., 2001a; Cassoni et al., 2001b; Morita et al., 2004; Pequeux et al., 2002). L'inhibition ou la prolifération cellulaire en réponse à l'OT serait tributaire de la localisation du récepteur au niveau de la membrane cellulaire (Cassoni et al., 2004). Lorsque le OTR est exclu d'un microdomaine membranaire riche en cavéoline, l'OT aurait un effet inhibiteur tandis que lorsque le OTR est inclus dans cette même zone, l'OT aurait un puissant effet mitogénique (Guzzi et al., 2002; Rimoldi et al., 2003). L'étude de Rimoldi et al, (Rimoldi et al., 2003) démontre que selon la localisation du



récepteur de l'ocytocine à l'intérieur ou à l'extérieur d'un microdomaine riche en cavéoline, différentes voies de signalisation peuvent être activées. Les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans l'activation d'OTR ne sont pas clairement identifiés encore à ce jour.

### **1.6.3 La voie conventionnelle de l'activation du récepteur de l'ocytocine**

L'hypothèse la plus probable actuellement concernant la voie d'activation classique du récepteur OTR suggère que lors de son activation, le récepteur serait principalement couplé à une protéine Gαq qui activerait la phospholipase C phosphoinositol spécifique (PLC) (Moore et al., 1988a; Ku et al., 1995) générant ainsi deux seconds messagers : l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) qui augmente le calcium intracellulaire et le 1,2-diacylglycérol (DAG) qui active la protéine kinase C (PKC) (Nishizuka, 1988; Ku et al., 1995; Copland et al., 1999b). C'est aussi la voie qui est associée avec l'effet prolifératif de l'ocytocine. Les récepteurs de l'ocytocine dans cette voie seraient localisés dans des microdomaines riches en cavéolines 1 grâce à leur association avec des cavéolines 2, empêchant ainsi leur internalisation par endocytose via les clathrines (Guzzi et al., 2002). L'activation de la protéine Gαq entraînerait la transactivation transitoire (30 minutes environ) de EGFR (epidermal growth factor receptor) ainsi que l'activation de ERK1/2 (Krishnaswamy et al., 2010; Rimoldi et al., 2003; Copland et al., 1999b; Pequeux et al., 2004). Par la suite, ERK1/2 pourrait initier la transcription de facteurs induisant la prolifération cellulaire par sa translocation dans le noyau.

Même si des résultats contradictoires sur l'implication de la voie de PLC/PKC/c-Src dans la prolifération cellulaire induite par l'ocytocine ont été rapportés par l'équipe de Rimoldi, l'implication de EGFR et ERK1/2 semble être unanimement démontrée (Rimoldi et al., 2003).

#### 1.6.4 La voie non-conventionnelle de l'activation du récepteur de l'ocytocine

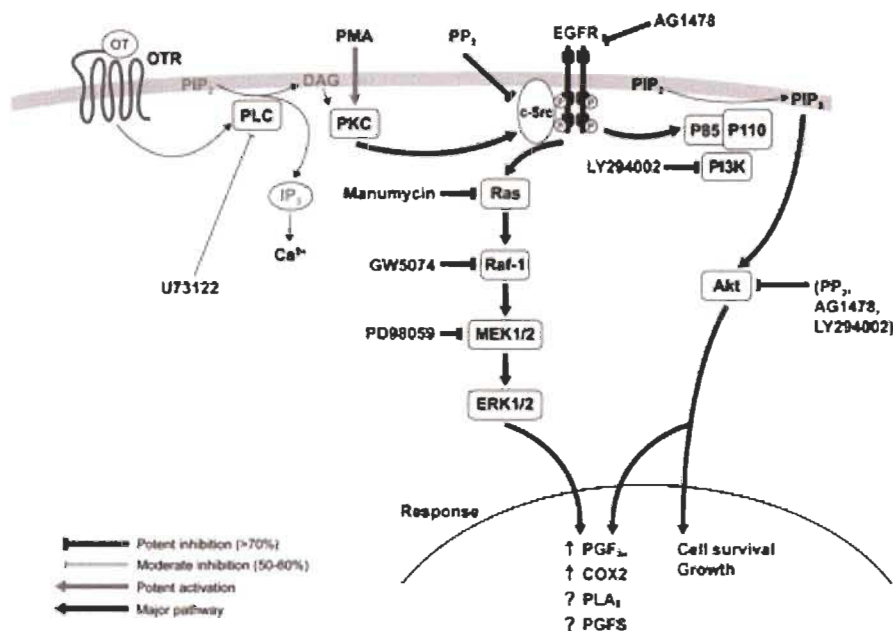
Dans la voie non-classique de l'activation du récepteur OTR, les récepteurs seraient situés à l'extérieur des microdomaines riches en cavéolines 1 et ne formeraient pas de complexes avec les cavéolines 2 (Guzzi et al., 2002). De plus, les récepteurs seraient internalisés par endocytose via les clathrines suivant la stimulation par l'ocytocine (Rimoldi et al., 2003). Cette voie est associée à l'effet inhibiteur de la prolifération en réponse à l'ocytocine. Ainsi, le récepteur activé serait couplé à une protéine  $G_{\alpha i}$  qui activerait également la voie de PLC/PKC/c-Src/EGFR/ERK1/2. Toutefois, la transactivation d'EGFR ne serait pas transitoire mais bien soutenue dans le temps, c'est-à-dire environ 12 heures, ce qui aurait pour effet d'activer l'inhibiteur de cycle cellulaire la  $p21^{WAF1/CIP1}$  (Rimoldi et al., 2003). La translocation d'ERK1/2 dans le noyau a aussi été constatée dans cette voie d'activation.

#### 1.6.5 Une troisième voie d'activation du récepteur de l'ocytocine?

Dans certains cas, l'ocytocine n'a aucun effet notable sur la prolifération cellulaire. Aussi, il est présumé que cette troisième voie d'activation du récepteur de l'ocytocine serait celle en lien avec la production des prostaglandines et fort probablement associée avec une protéine  $G_{\alpha s}$  (Guzzi et al., 2002; Rimoldi et al., 2003). Il est bien connu que le récepteur OTR active la phospholipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>) et la production de prostaglandines via l'activation de la PLC et de COX-2 (Moore et al., 1988b; Asselin et al., 1997). Les travaux de Strakova et al. ainsi que Molnar et al., (Strakova et al., 1998; Molnar et al., 1999) ont démontré que l'activation de la PKC ainsi que la phosphorylation de ERK2 étaient des étapes essentielles dans la production des prostaglandines en réponse à l'ocytocine. Très récemment, il a été démontré que la transactivation d'EGFR était une étape obligatoire dans la production de prostaglandines en réponse à l'ocytocine et que cela activait simultanément les voies de ERK1/2 et de PI 3K (Figure 1.15) (Krishnaswamy et al., 2010).

L'activation de la voie PLC/PKC/c-Src/EGFR/ERK1/2 par le récepteur OTR semble être un événement commun dans les trois voies d'activation. Par contre, il reste

encore beaucoup de questions à élucider sur la façon dont l'activation du récepteur OTR peut produire des effets aussi différents sur la prolifération cellulaire et quel est le rôle des prostaglandines dans ces processus.



**Figure 1.15 : Modèle proposé pour la production des prostaglandines en réponse à l'ocytocine.**

Tiré de Krisnamaswamy et al., (2010), *Endocrinology*, 151 (3) : 1367-74

## 1.7 Le cancer endométrial

### 1.7.1 L'utérus, organe gestationnel

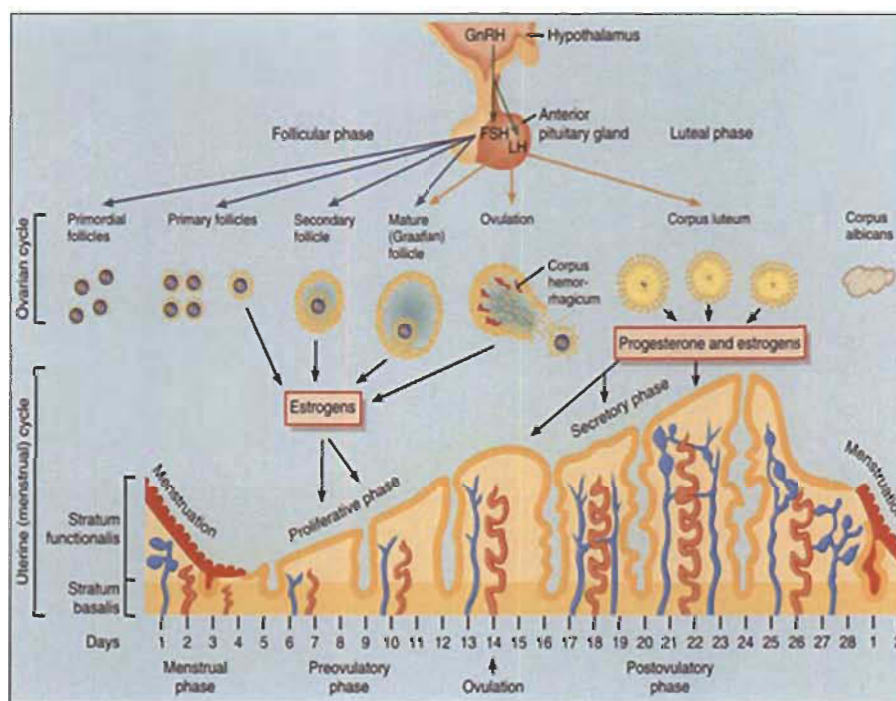
L'utérus est un organe musculaire creux qui est situé dans le petit pelvis, entre la vessie et le rectum, à la forme d'une poire inversée (Larousse, 1998). Dans sa partie moyenne, un rétrécissement appelé isthme sépare la cavité utérine en deux portions :

a) le corps de l'utérus, qui correspond à la portion renflée supérieure qui reçoit entre autre le segment utérin des trompes de Fallope et b) la portion inférieure qui constitue le col de l'utérus (Abbara, 2009). L'utérus est composé de trois couches distinctes. La couche la plus externe, qui recouvre l'utérus, est une séreuse péritonéale alors que la couche intermédiaire forme l'épaisse paroi musculaire lisse appelée myomètre. La couche interne pour sa part est constituée d'une muqueuse richement vascularisée : c'est l'endomètre. Cette dernière est composée d'un épithélium de type müllérien qui comprend des cellules ciliées et des cellules glandulaires (Kasas, 2008). Aussi, l'endomètre se divise en deux couches : a) la couche fonctionnelle qui subit les transformations cycliques et qui se désagrège lorsqu'il y a absence de fécondation/nidation provoquant la menstruation et b) la couche basale (ou résiduelle) servant à régénérer la muqueuse (Marieb, 1999a; Schöni-Affolter, 1999).

### **1.7.2 Le cycle menstruel**

Le cycle menstruel se définit comme une série de modifications cycliques de l'endomètre en réponse aux variations des hormones ovariennes. La durée d'un cycle varie habituellement entre 24 et 35 jours et se divise en quatre phases : la phase menstruelle, la phase préovulatoire, l'ovulation et la phase sécrétoire (Marieb, 1999a; Tortora and Grabowski, 2001) (Figure 1.16). Au cours de la phase menstruelle ou menstruation, qui dure de trois à cinq jours, il y a desquamation de tout l'endomètre sauf de la couche basale suite à la diminution des hormones ovariennes, surtout la progestérone (Marieb, 1999a; Tortora and Grabowski, 2001). La phase préovulatoire est d'une durée variable et détermine la longueur du cycle menstruel. Elle s'étend du jour six au jour treize. Au cours de cette phase, l'endomètre se reconstitue sous l'influence des oestrogènes provenant des follicules ovariens en croissance. La couche basale génère une nouvelle couche fonctionnelle par une activité mitotique intense, les glandes grossissent et les artérioles s'enroulent et allongent (Marieb, 1999a; Tortora and Grabowski, 2001). L'ovulation survient vers le 14e jour du cycle, libérant un ovocyte primaire dans la cavité pelvienne. La phase sécrétoire est la phase la plus constante du cycle avec une durée de quatorze jours. L'endomètre se prépare à l'implantation d'un

ovule fécondé. Le corps jaune produit de la progestérone et des œstrogènes qui favorisent le développement et l'enroulement des artères spiralées, l'épaississement de la couche superficielle de l'endomètre et l'activité sécrétoire des glandes utérines. S'il n'y a pas de fécondation, le corps jaune dégénère entraînant la diminution du taux de progestérone et par conséquent la menstruation (Marieb, 1999a; Tortora and Grabowski, 2001).



**Figure 1.16 : Cycle menstruel de la femme.**

Tiré de Tortora and Grabowski, "Tortora, Grabowski : Principles of Anatomy and Physiology", 2001, 9th Edition, ERPI.

### 1.7.3 Le cancer de l'utérus : type I et II

Le vocable «cancer de l'utérus» est largement utilisé afin de désigner plusieurs types de tumeurs qui peuvent se développer dans cet organe cependant, *stricto sensu*, il s'agit bel et bien du cancer de l'endomètre. Presque tous les cancers qui affectent l'utérus naissent du tissu glandulaire de l'endomètre et sont désignés par l'appellation d'adénocarcinome. L'adénocarcinome endométrioïde est le plus commun des adénocarcinomes avec une occurrence de 80 à 95 % des cas (Rahaman and Cohen,

2006). Il est caractérisé par une disparition du stroma entre les glandes anormalement développées. C'est le type I du cancer de l'endomètre (Bokhman, 1983) et il est relié à l'exposition aux œstrogènes endogènes et/ou exogènes (Deligdisch and Holinka, 1987; Bokhman, 1983; Rahaman and Cohen, 2006). L'apport œstrogénique sans opposition par la progestérone induit une hyperplasie de l'endomètre pouvant conduire éventuellement à un processus de cancérisation. Selon certaines études, entre 5 et 25 % des hyperplasies endométriales présentant des atypies cytologiques évoluent vers le cancer de l'endomètre (Kurman et al., 1985; Brand, 2000; Rahaman and Cohen, 2006). Ce type de cancer est généralement bien différencié et peu invasif offrant ainsi un pronostic plus favorable. Il survient le plus souvent après la ménopause, entre 57 et 60 ans, mais très rarement avant 35 ans (Brand, 2000; Bokhman, 1983; Rahaman and Cohen, 2006). Les facteurs de risque qui lui sont associés sont a) la nulliparité ou grossesse tardive, b) début précoce des règles, c) ménopause tardive (après 52 ans), d) l'obésité, surtout si associé à un diabète/hypertension et à la nulliparité, e) les syndromes associés aux troubles ovulatoires ou ovariens (Stein-Léventhal, tumeur de la thèque, tumeur de la granulosa), f) traitement hormonal substitutif exclusivement œstrogénique, ainsi que g) le tamoxifène, un anti-œstrogène de synthèse utilisé dans le traitement du cancer du sein (Bokhman, 1983; Noël et al., 2002; Rahaman and Cohen, 2006).

Le type II du cancer de l'endomètre est beaucoup moins fréquent avec moins de 20 % des cas (Bokhman, 1983). Les adénocarcinomes séreux, squameux et à cellules claires font partie de cette catégorie. Ce type de cancer est souvent peu ou pas différencié, plus agressif et invasif, offrant un pronostic plus sévère. Il n'est pas relié à une surexposition œstrogénique ni à une hyperplasie endométriale. Il survient principalement chez la femme plus âgée, soit entre 65 et 70 ans (Slomovitz et al., 2003).

#### **1.7.4 Manifestations cliniques**

Plus de 90 % des patientes atteintes du cancer de l'endomètre présentent comme signes cliniques des saignements utérins et/ou écoulements vaginaux anormaux

favorisant un diagnostic et un traitement précoces alors que la tumeur est encore circonscrite à l'utérus (ACOG, 2005). Le cancer peut également se manifester par des douleurs dans le bassin, dans le dos ou les jambes, lors de miction ou de relations sexuelles (Société Canadienne du Cancer, 2011).

### **1.7.5 Fréquence du cancer de l'endomètre**

Au Canada et aux Etats-Unis, le cancer de l'endomètre occupe le 4<sup>ième</sup> rang des cancers les plus fréquents à survenir chez la femme après le cancer du sein, du poumon et le cancer colorectal (Rahaman and Cohen, 2006; Société Canadienne du Cancer et al., 2012). Selon les estimations statistiques obtenues, c'est un peu plus de 5300 canadiennes qui auront reçu un diagnostic de cancer endométrial en 2012 (Société Canadienne du Cancer et al., 2012). Aussi, 900 décès seront attribués à ce cancer au cours de cette même année au pays (Société Canadienne du Cancer et al., 2012). Depuis 1988, la fréquence du cancer endométrial est en augmentation de 0,6 % par année dans les pays industrialisés et serait attribuable à l'augmentation de l'espérance de vie des femmes ainsi qu'à l'amélioration des techniques de dépistage (Rahaman and Cohen, 2006). Le taux de survie après 5 ans atteint respectivement 96 % dans le cas d'un cancer localisé à l'utérus, 67 % si le cancer est confiné dans la région pelvienne et 17 % si le cancer présente des métastases (Jemal et al., 2010).

### **1.7.6 Stadification et grades**

La stadification d'un cancer permet de définir le pronostic et de déterminer le traitement approprié. Le stade correspond au degré d'extension de la tumeur et le grade à la malignité des cellules cancéreuses. Pour le cancer de l'endomètre, la stadification de la Fédération Internationale de Gynécologie d'Obstétrique (FIGO) est utilisée (Lewin, 2011). Globalement, le cancer de l'endomètre est limité au corps de l'utérus dans le stade I ; dans le stade II, la tumeur envahie le col de l'utérus ; dans le stade III, le cancer s'est propagé à l'extérieur de l'utérus mais demeure confiné aux tissus pelviens avoisinants (ganglions et vaisseaux lymphatiques) et finalement, le stade IV présente des

métastases à distance dont les organes atteints sont généralement la vessie, le rectum, le foie, les poumons ou les os (Plaxe and Mundt, 2009a; Rahaman and Cohen, 2006).

Les grades histologiques quant à eux s'étendent de 1 à 3 pour le cancer de l'endomètre. Les cellules cancéreuses présentant une croissance lente avec un risque de propagation peu élevé sont de grade 1 (5 % et moins de cellules non différenciées); risque modéré de grade 2 (6 à 50 % de cellules non différenciées) et ceux avec une prolifération rapide à hauts risques de propagation, de grade 3 (plus de 50 % de cellules non différenciées) (Plaxe and Mundt, 2009a; Rahaman and Cohen, 2006).

### **1.7.7 Traitements**

L'approche thérapeutique curative ou palliative est déterminée par l'état général de la patiente, le type de cancer de l'endomètre et ses caractéristiques ainsi que par le stade et le grade de la maladie (Plaxe and Mundt, 2009a; Rahaman and Cohen, 2006). Les traitements utilisés lors du cancer de l'endomètre sont la chirurgie, l'hormonothérapie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Les traitements peuvent être administrés isolément ou en association selon les besoins et l'efficacité recherchée. La procédure thérapeutique traditionnelle consiste à effectuer chirurgicalement une hystérectomie totale avec salpingo-ovariectomie bilatérale c'est-à-dire l'ablation totale de l'utérus, des trompes de Fallope ainsi que des deux ovaires combinée avec la radiothérapie. Lorsque l'invasion des paramètres avoisinants est redoutée ou détectée, l'exérèse des ganglions et vaisseaux lymphatiques pelviens peut également être effectuée (Plaxe and Mundt, 2009a; Rahaman and Cohen, 2006).

La radiothérapie utilise le rayonnement ionisant (rayons X, rayons  $\gamma$ ) afin de détruire ou du moins ralentir la prolifération des cellules cancéreuses (Mundt et al., 2006). La radiothérapie externe est la technique la plus usitée. Quant à elle, la curiethérapie ou radiothérapie interne consiste à introduire une source radioactive à l'intérieur du vagin ou de l'utérus pendant quelques heures. La radiothérapie peut aussi entraîner des effets de toxicité aigüe ou tardive selon les doses reçues et la localisation



de l'irradiation (Mundt et al., 2006; Plaxe and Mundt, 2009a; Rahaman and Cohen, 2006).

L'hormonothérapie et la chimiothérapie font partie des traitements systémiques généralement administrés lors d'atteintes cancéreuses de stade plus avancés ou lors de récurrences (Plaxe and Mundt, 2009a; Rahaman and Cohen, 2006; Plaxe and Mundt, 2009b). L'hormonothérapie est une option très attrayante parce qu'elle est normalement bien tolérée par les patientes et ne présente pas la même toxicité que la chimiothérapie. La progestérone ou les progestatifs tels que l'acétate de mégestrol, l'hydroxyprogestérone et le médroxyprogestérone sont utilisés. L'hormonothérapie est plus souvent proposée aux femmes âgées ou dans les cancers d'évolution lente. La chimiothérapie est indiquée surtout lorsque le cancer s'est étendu au-delà de l'endomètre ou pour les cancers plus agressifs. Les médicaments sont habituellement administrés par voie intraveineuse. Les molécules actives sont la doxorubicine (Thigpen et al., 2004), les sels de platine (van Wijk et al., 2003; Thigpen et al., 1989) et le paclitaxel (Lincoln et al., 2003) avec une réponse variant entre 17 et 28 % selon les composés sauf pour le paclitaxel qui obtient un taux de 37 % (Plaxe and Mundt, 2009b). Afin d'augmenter leurs efficacités, les agents chimiothérapeutiques sont utilisés en association atteignant ainsi une réponse de 36 à 67 % (Plaxe and Mundt, 2009b). Généralement, la doxorubicine est utilisée seule ou combinée avec le cisplatine alors que le paclitaxel est jumelé avec le carboplatine. Comme la chimiothérapie affecte autant les cellules saines que les cellules cancéreuses, des effets secondaires apparaissent pendant le traitement ou dans les jours suivants et varient d'un individu à l'autre et d'un agent chimiothérapeutique à l'autre.

## 1.8 Les objectifs

### 1.8.1 Caractérisation d'une nouvelle lignée du cancer endométrial

Bien que le cancer de l'endomètre soit normalement dépisté à un stade très précoce et soit ainsi facilement curable, les patientes présentant des métastases ont moins de 20 % de chance de survivre à leur cancer. Actuellement, très peu de modèles expérimentaux sont disponibles pour la recherche sur le phénotype métastatique dans le cancer endométrial. Dans ce volet, nous avons caractérisé une nouvelle lignée cellulaire du cancer endométrial, pauvrement différenciée et particulièrement agressive, issue d'une métastase ovarienne: EN- 1078D. Nous avons établi les caractéristiques de croissance de la nouvelle lignée, son génotype, la présence des récepteurs stéroïdiens sexuels, les mutations/amplifications des principaux oncogènes, la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques, sa capacité d'invasion ainsi que sa tumorigénicité *in vivo*. Le but de ce travail était de rendre disponible un nouvel outil/modèle expérimental pour étudier les mécanismes impliqués dans l'invasion des cellules cancéreuses endométriales et leur régulation par les hormones stéroïdiennes.

Vous pourrez prendre connaissance de l'article scientifique qui se rapporte à cette étude dans le chapitre II ainsi que dans les sections discussion & perspectives ainsi que dans les conclusions générales du chapitre V.

### 1.8.2 L'ocytocine et l'invasion des cellules du carcinome endométrial

Dans ce deuxième volet nous nous sommes intéressés à l'ocytocine, une petite hormone capable d'induire la production de prostaglandines via la cyclooxygénase-2 chez les cellules endométriales saines. Plusieurs études suggèrent que COX-2 pourrait jouer un rôle important dans le développement et la progression du cancer ainsi que dans la métastase (Dubois et al., 1998 ; Ferrandina et al., 2002 ; Greenhough et al., 2009). Les objectifs de ce travail étaient donc de déterminer si a) l'ocytocine peut induire l'expression de COX-2 chez les cellules du cancer endométrial humain, b) si la voie de PI 3-K/Akt est impliquée dans cette réponse et c) si l'ocytocine peut favoriser l'invasion

des cellules cancéreuses via la production de prostaglandines et identifier quelques acteurs dans cette réponse.

Vous pourrez prendre connaissance de l'article scientifique qui se rapporte à cette étude dans le chapitre III, des résultats non publiés en lien avec cette étude dans le chapitre IV ainsi que dans les sections discussion & perspectives ainsi que dans les conclusions générales du chapitre V.

## CHAPITRE II

### CHARACTERIZATION OF EN-1078D, A POORLY DIFFERENTIATED HUMAN ENDOMETRIAL CARCINOMA CELL LINE: A NOVEL TOOL TO STUDY ENDOMETRIAL INVASION *IN VITRO*

Ce chapitre est présenté sous forme d'article, en anglais, et a été publié dans la revue *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2007, Sep 25; 5 :38 :

#### 2.1 Contribution des auteurs

L'ensemble des expérimentations à la base de cet article a été effectué par Marie-Claude Déry qui a fait l'écriture de l'article ainsi que toutes les expériences hormis celles en lien avec le caryotype qui a été effectué par la Dre Dominique Bérubé, (cytogénéticienne) et celles en lien avec la microscopie électronique par Dre Agnès Lejeune. Également, Dre Céline Van Themsche a procédé aux injections des cellules tumorales lors de l'essai de tumorigénicité *in vivo* alors que les Dres Diane Provencher et Anne-Marie Mes-Masson ont procédé à l'établissement de la nouvelle lignée cellulaire et fourni les données de la patiente. Le manuscrit a été révisé et corrigé par les Drs Céline VanThemsche et Eric Asselin, directeur de recherche. Dr Asselin a également contribué à la planification des expériences et l'encadrement des travaux.

#### 2.2 Résumé

À ce jour, les modèles pour étudier la métastase dans les cancers endométriaux sont peu nombreux. Le but de cet article était de caractériser la lignée cellulaire EN-1078D, une nouvelle lignée du carcinome endométrial dérivée d'une métastase ovarienne. Les cellules ont été caractérisées à l'aide de la cytologie, de la microscopie électronique, du caryotype et de l'apparence morphologique des cellules en culture. Les

particularités moléculaires de la lignée ont été déterminées par RT-PCR, par immunobuvardage de type western blot, par hybridation fluorescente *in situ* (FISH) et par séquençage. Des essais de prolifération cellulaire MTT ont été effectués afin d'investiguer la sensibilité de EN-1078D aux agents anticancéreux tels que le cisplatine et la doxorubicine. Aussi, des injections sous-cutanées et intraveineuses des cellules tumorales EN-1078D ont été effectuées chez des souris nu/nu afin de vérifier le potentiel tumorigénique et métastatique de la nouvelle lignée. Nos résultats indiquent que les cellules de EN-1078D expriment les deux récepteurs oestrogéniques (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) et très peu du récepteur progestéronique B (PR-B). De plus, la lignée surexprime l'ARNm de la MMP-2 et de son activateur la MMP-14 parallèlement à de très bas niveaux d'expression des inhibiteurs des métalloprotéinases TIMP-1 et TIMP-2. Également, toutes les souris nu/nu ont développées des tumeurs sous-cutanées et l'invasion cellulaire *in vitro* a été notée en réponse au TGF- $\beta$  3. Le proto-oncogène Her-2/neu n'est pas amplifié mais des mutations dans le domaine C2 de PTEN ainsi que dans le codon 12 du gène K-Ras. Finalement, EN-1078D démontre de la sensibilité aux drogues communément utilisées en chimiothérapie avec un IC50 de 2,8  $\mu$ M de cisplatine après 72 heures d'exposition et 0,54  $\mu$ M de doxorubicine après 48 heures. Tous ces résultats suggèrent que la nouvelle lignée EN-1078D peut être un excellent modèle pour étudier les propriétés métastatiques des cellules du cancer endométrial *in vitro* ainsi que leur régulation par les stéroïdes sexuels.

## 2.3 Article scientifique

### Characterization of EN-1078D, a poorly differentiated human endometrial carcinoma cell line: a novel tool to study endometrial invasion *in vitro*

Marie-Claude Dery<sup>1</sup>, Celine Van Themsche<sup>1</sup>, Diane Provencher<sup>2</sup>, Anne-Marie Mes-Masson<sup>2</sup>, Eric Asselin\*

<sup>1</sup>Département de Chimie-Biologie, Groupe de Recherche en Biopathologies Cellulaires et Moléculaires, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7;

<sup>2</sup>Département d'Obstétrique-Gynécologie/Département de Médecine, Université de Montréal; Institut du Cancer de Montréal; Centre Hospitalier de l'UdeM (CHUM) – Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada H2L 4M1.

#### 2.3.1 Abstract

**Background:** To date, tools to study metastasis in endometrial cancers are insufficiently developed. The aim of this study was to characterize the cell line EN-1078D, a new endometrial carcinoma cell line derived from a metastasis to the ovary.

**Methods and Results:** Cells were characterized using cytology, transmission electron microscopy, karyotyping and morphological appearance in culture. Molecular features were determined by RT-PCR, Western Blot, FISH and sequencing. MTT proliferation assays were performed to investigate the sensitivity of EN-1078D to anticancer agents such as cisplatin and doxorubicin. Also, subcutaneous and intravenous injections in nude mice were done to test the tumorigenic and metastatic properties of EN-1078D cells. Our results indicate that EN-1078D cells express both oestrogen receptors isoforms (ER alpha and ER beta) and also low levels of progesterone receptor B (PR-B). In addition, this cell line expresses high levels of MMP-2 and MMP-14 mRNA, low levels of

TIMP-1 and TIMP-2 transcripts and no detectable levels of MMP-9 mRNA. Moreover, all nude mice developed tumors by subcutaneous injections and cell invasion was observed *in vitro* in response to TGF-beta 3. Her-2/neu was not overamplified but mutations in the C-2 domain of PTEN gene as well as codon 12 of the K-Ras gene were found. Finally, EN-1078D shows sensitivity to drugs commonly used in chemotherapy such as cisplatin and doxorubicin: IC50 of 2.8  $\mu$ M of cisplatin after 72 hours of exposure and 0.54  $\mu$ M of doxorubicin after 48 hours.

**Conclusion:** Taken together, these results suggest that EN-1078D will be an excellent tool to study the properties of metastatic endometrial cancer cells *in vitro* and their regulation by sex steroids.

### 2.3.2 Introduction

Uterine cancer is the fourth commonly diagnosed cancer among women in the North America. Ninety-seven percent of all cancers of the uterus arise from the glands of the endometrium and are known as endometrial carcinomas [1]. When diagnosed at early stages of the disease, this type of cancer is a highly curable malignancy with a 5-year relative survival rate of more than 80% [2]. However, patients presenting metastases have a 5-year survival rate of less than 20% [2]. Indeed, metastasis represents the main cause of death for patients with endometrial carcinoma. Very few models are available, to date, for the experimental characterization of factors involved in the metastatic phenotype in endometrial carcinoma cells.

Cell models of endometrial cancers are characterized by particular gene expressions and mutations which stratify the disease. The cytokeratins (Ker) and other types of intermediate filaments are routinely used as indicators of tumor cell types as well as markers of differentiation [3], because their composition in any particular epithelium is predictable [4]. The presence of functional steroid receptors, estrogen receptor alpha and beta (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ), progesterone receptor A and B (PR-A and PR-B) has been quantitatively associated with histologic differentiation [5], response to therapy [6] and

metastatic potential [7]. Sex steroid hormones influence the metastatic phenotype in cancer cells, notably by regulating adhesion/de-adhesion events, angiogenesis, cellular invasion into the basement membrane and interstitium [8]. Therefore, the expression levels of ER and PR, as well as the impact of sex steroids are important regulators of endometrioid cells.

The uterus undergoes extensive tissue remodelling throughout each reproductive cycle and these dynamics change are regulated, in part, by the matrix metalloproteinase (MMP) system [9]. The MMPs are a family of proteolytic enzymes that can cleave a large array of extracellular matrix (ECM) proteins as well as other cellular, non-matrix proteins. Particular MMPs (including MMP-2, MMP-9 and MMP-14) are involved in key events in cancer cells, including proliferation, apoptosis and angiogenesis [10;11]. Importantly, loss of control of MMP activity has been linked to the malignant potential of tumors by enhancing invasion and metastasis [12]. When present in sufficient amount, the tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) specifically inhibit MMP activity [11]. These interplay of these molecules are critically important in tumor metastasis.

Mutations in particular oncogenes and tumor suppressor genes can promote cancer cell development and their characteristic profile can help identify cancer cell types. Mutations in the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome Ten (PTEN) gene can be found in approximately 50% of endometrial cancer cells [13-15]. Mutation in both PTEN gene alleles results in the expression of an inactive PTEN protein, which can not prevent activation of activated-by-kinas-tyrosine protein also called Akt and results in constitutively active Akt pathway. Since active Akt blocks the action of several pro-apoptotic proteins [16], apoptosis is deregulated in mutated PTEN cells. Mutational activation of K-ras (Kirsten rat sarcoma) has been observed in 10-30% of endometrioid carcinoma [17]. Ras is a signal transducer located on the inner surface of the plasma membrane. Hyperexpression of *ras* results in growth stimulation, whereas point mutations at codons 12, 13, and 61 alter its structure, preventing inactivation and causing cell transformation [18]. Amplification of Her-2/neu, a proto-oncogene with a high degree of homology to the epidermal growth factor



(EGF), is associated with local invasion and tumor progression of endometrial carcinoma [19-22]. As these molecular alterations are hallmarks of endometrioid cancers, their characterization in cellular models is important. We had the opportunity to characterize a new endometrial cell line that was recently derived from an ovarian metastase, which represents a putative new tool for the study of endometrial carcinoma metastasis *in vitro*. We have extensively characterized this cell line in term of growth and molecular properties.

Finally, deregulated apoptotic mechanisms that allow cancer cell to proliferate and metastasize can lead to cancer cell resistance to pro-apoptotic agents such as chemotherapeutic drugs. We have characterized the response of EN-1078D cells to the main chemotherapeutic agents currently used for the treatment of endometrial cancer, cisplatin and doxorubicin. Together, this information can be applied to cellular and molecular studies in EN-1078D.

### **2.3.3 Materials and methods**

#### ***Patient data***

The donor of the EN-1078D cell line was a 52-year-old woman, gravida 1, para 1, menopausal since two years. Histopathological examination revealed an endometrial adenocarcinoma poorly differentiated stage IIIC, with ovarian and ganglionic metastasis. At the time of surgery, the advanced tumoral invasion of the uterus did not allow its removal and bilateral ovariectomy was done. The patient was initially treated with megestrol acetate (160 mg/day) associated with local radiotherapy (45 Gy) and endocervical curietherapy. Six years after the initial surgery, the patient is still alive without recurrence.

#### ***Histology of the original tissue and cell line establishment***

The cell line was obtained from a patient of Centre Hospitalier de l'Université de Montréal and isolated from a metastase which completely replaced the ovaries. Informed

consent was obtained and research studies approved by the Montreal University Institutional Review Board. The ovarian tumor consisted mainly of cells in Indian file with some glandular structures and central necrosis typical of an endometrial biopsy. At histopathological examination, immunohistochemistry analysis revealed 80% positivity staining for oestrogenic receptors and 25% for progesteronic receptors. Cells were established in culture as described previously [23]. Briefly, tumor tissue was minced with scissors into 2-4 mm explants in OSE media (without Fetal Bovine Serum (FBS)). Enzymatic dissociation was accomplished by digestion with collagenase and aggregates were dissociated by gently pipetting. The cellular fraction was diluted 1:5 in OSE media supplemented with 10% v/v FBS and incubated undisturbed at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>/air for 24-48 hours. After cells had adhered to the plastic, they were washed once in PBS and subsequently passaged in OSE/10% v/v FBS until the cell line was stably established. Afterwards, the cells were grown and maintained in DMEM-F12 with HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), and the medium was supplemented with 10% v/v bovine growth serum (BGS) and 50 µg/ml gentamycin. Until now, the cell line was subcultured more than a 100 passages and is preserved under cryogenic conditions (5% v/v DMSO (dimethyl sulfoxide)/culture media, in liquid nitrogen). Experiments using this cell line were carried out after long term passage (> 76 passages). For experimentation without steroid hormones, the cell line was cultured at least two weeks in phenol-free DMEM-F12 supplemented with 10% v/v dextran-charcoal stripped FBS (FBS DC) and 50 µg/ml gentamycin, prior experimentation.

### ***Morphology of the cultured cells***

Cells grown in culture flasks were photographed by phase-contrast microscopy. For transmission electron microscopy study, the cells were grown to confluence in culture flasks. They were washed with 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4) and fixed with 2.5% v/v glutaraldehyde in cacodylate buffer for 1 hour at room temperature. After washing twice with buffer, the cell layer was delicately detached with the help of cell scraper (Costar, VWR Canlab, Mississauga, ON, CA) and was postfixated with 1% v/v osmic acid

for 1 hour at room temperature. The cells were then washed in cacodylate buffer, dehydrated in graded concentrations of ethanol and embedded with Spurr overnight. After polymerization, thin sections were contrasted with 4% w/v uranyl acetate in 50% v/v methanol following by lead citrate coloration. Specimens were examined and photographed with a Phillips EM 208S electron microscope.

### ***In vitro growth assays***

Growth curves were performed by seeding cells ( $1 \times 10^5$ ) into 42 flasks ( $25\text{-cm}^2$ ) in fresh culture medium (reference day 1). From day 2 to day 15, total cell numbers of 3 flasks were counted with a hemocytometer and discarded thereafter [24]. The media was changed every 3 days. The population doubling time was calculated from the slope of the growth curve during the logarithmic phase while saturation density was determined by the plateau phase. For plating efficiency studies, one hundred cells were plated in 100-mm petri dishes. After two weeks, the colonies formed were fixed in 95% v/v ethanol and stained with methylene blue. Plating efficiency was determined by the ratio of the number of colonies (more than 50 cells) to the total number of inoculated cells [25]. The experiments were done at each ten passages and were repeated ten times.

### ***In vivo growth assays***

Subcutaneous tumor xenografts were established in four 6-week-old nude mice (Charles River Laboratories, Lasalle, Qc, CA) by injection of  $1 \times 10^6$  EN-1078D cells in 100  $\mu\text{L}$  of 2 mg/mL Matrigel (VWR, Mississauga, ON, CA). The mice were injected at both flanks near the posterior legs. The day following inoculation, mice received a subcutaneous injection of 17  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) (0.15 mg/animal in 5% cremophor and 5% ethanol saline solution) to stimulate cell proliferation. Tumor size was measured once a week using calipers. Tumor volume was calculated using the formula  $0.5 \times \text{length} \times (\text{width})^2$  [26]. Eight weeks after injection, mice were killed and tumors were harvested. The tumors were fixed in 10% v/v formalin solution and embedded in paraffin. Tumor sections (7 $\mu\text{m}$ ) were mounted on polylysine-coated slides, deparaffinized, rehydrated, and then stained with haematoxylin.

### ***Invasion assay***

Cells were treated or not with Transforming growth factor-beta3 (TGF- $\beta$ 3) (10 ng/ml) for 24 hours and then trypsinised and washed in fresh media with serum. Cells were then resuspended in media without serum and counted.  $3 \times 10^4$  cells were plated in a Transwell<sup>®</sup> Permeable support (Costar 3432, Corning, USA) with a 8.0  $\mu$ M pore size polycarbonate membrane. Prior to cell plating, a layer of BD Matrigel Low<sup>™</sup>, diluted 1:5 in fresh media without serum was prepared and solidified. Fresh media with 10% BGS was put in the well below the support. Cells were cultured for 24 hours. At the end of the assay, the cells which had adhered in the bottom of the well and/or in filter were counted. These experiments were repeated 3 times.

### ***Cytogenetic analysis***

Repeated chromosome analyses were carried out at each ten passages to examine the *in vitro* chromosomal evolution of this cell line. A total of 160 metaphases spreads were photographed and the chromosome numbers in each spread were counted. Harvesting, fixation, R and G-banding of the chromosomes were induced by using classical techniques in cytogenetic. To confirm chromosome X and copy number of the Her-2/neu gene, we performed fluorescence in situ hybridization (FISH) with painting probes CEP X (DXZ1)/Y (DYZ1) alpha satellite III and Her-2 IVD Kit (Vysis/ Abbott Laboratories, Mississauga, ON, CA) according to the protocols supplied by the company and analyzed the karyotype with Cytovision.

### ***MTT proliferation assays***

For drugs assay, cells were plated at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells/well in 96-wells plates, 24 hours before the assay. Cells were cultured for 24, 48 and 72 hours in the presence of increasing concentrations of cisplatin and doxorubicin (0; 0.625; 1.25; 2.5; 5; 10 and 20  $\mu$ M in DMF (dimethylformamide)). HeLa, a cervical cancer cell line, which we have previously found to be sensitive to these drugs was used as positive control, while KLE, an endometrial adenocarcinoma cell line poorly inhibited by the drug, was used as

negative control. For steroid hormones assays, cells cultured in phenol-free media were plated at a density of  $2 \times 10^4$  cells/well in 96 wells plate, 24 hours before the assay. Preliminary dose-response assays were done to determine the treatments conditions: cells were cultured for 48 hours with  $10^{-6}$  M of progesterone ( $P_4$ ) and for 24 hours with  $10^{-7}$  M of  $E_2$ , supplemented with 1% FBD DC. At the end of the culture period, 10  $\mu$ l of MTT (5 mg/ml, thiazolyl blue tetrazolium bromide) was added to each well. After 4 hours of incubation with MTT, 100  $\mu$ l of solubilization solution was added (10% w/v SDS in 0.01M HCl) and the microplate was incubated overnight (37°C, 5%  $CO_2$ /air). The OD (620 nm) was read with the Fluostar Optima reader. The experiments were repeated 3 times.

### ***Semi-quantitative RT-PCR analyses***

In order to measure the presence or absence of transcripts for keratins, oestrogen and progesterone receptors, vimentin and desmin, semi-quantitative RT-PCR analyses were performed. Primers (Invitrogen, Burlington, ON, CA) chosen are described in Table I. Conditions were optimized by testing different primer concentrations and different number of cycles to avoid near-plateau or saturated reactions. Total RNA (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l) was used for preparation of first strand cDNA by reverse transcriptase (RT). The RNA samples were incubated (65°C, 10 min) with 2:1 oligo dT (deoxythymidine) primers in a final volume of 10:1. Samples were then incubated (37°C, 60 min) in 20:1 of a reaction buffer 10X containing dithiothreitol (DTT, 100 mM), deoxynucleotide triphosphate (dNTPs, 5 mM) and Muloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT, 200 U). The reaction volumes were brought up to 60:1 with autoclaved water. A negative control was also included to control for contaminating genomic DNA in the RNA template.

Each reaction mixture (final volume 50:1) contained 1X Buffer, RT template or negative control (5:1),  $MgCl_2$  (50mM), dNTPs (5mM), primers (pM; 2,5:1 each) and Taq polymerase (5 U/ $\mu$ l). The PCR cycling conditions chosen were 30 sec at 94°C, 30 sec at the appropriate annealing temperature and extension time at 72°C (Table 1), followed by

a 5 min extension at 72°C. Reaction products were analysed on 1% w/v agarose gels. Bands were visualized by ethidium bromide staining.  $\beta$ -actin was used as loading control for each experiments.

### ***Protein extraction and Western analysis***

Cells were trypsinized, lysed in lysis buffer (PBS 1X pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Indianapolis, IN, USA), frozen and thawed three times, and centrifuged (15,700 g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. Supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay (Bio Rad, Mississauga, ON, CA). Protein extracts (50  $\mu$ g except for cytokeratins where 25  $\mu$ g was used) were heated (95°C, 3 min), resolved by 8, 10 or 14% w/v SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electro-transferred to nitrocellulose membranes (15 V, 30 min) using a semi-dry transfer apparatus (Bio-Rad). Membranes were then blocked (1 hr, RT) with PBS 1X containing 5% w/v non-fat milk powder, and then incubated with primary antibody (ER $\alpha$ : LabVision Ab15, dilution 1:500, positive control MS-1071-PCL; ER $\beta$ : Labvision beta Ab-24 1:2000, positive control RB-037-PCL; PRA-B: Cell Signaling #3172 dilution 1:1000; Pan-cytokeratins: Sigma c-2562, dilution 1:75000) overnight (except for  $\beta$ -actin, one hour) at 4°C, and subsequently with Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:4000; RT, 45 min) or with HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody (1:2500; RT, 45 min). Peroxydase activity was visualized with the Super Femto kit (Pierce/ Fisher, Nepean, ON, CA), according to the manufacturer's instructions.  $\beta$ -actin was used as a loading control for each experiments (Sigma A-3854 clone AC-15, dilution 1:60000, one hour).

### ***Sequencing of the PTEN and K-ras genes***

Mutation of the PTEN and K-ras gene at codons 12/13 and 61 respectively were examined by sequencing early passage EN-1078D. PTEN and K-ras gene were

amplified by PCR using the following primer pairs: for PTEN, 5'-CCCAGACATGACAGCCATC-3' (forward) and 5'-TTTCATGGTGTTCCTCTT-3' (reverse); for K-ras, 5'-AGGCCTGCTGAAAATGACTG-3' (forward) and 5'-TCCTGAGCCTGTTTGTGTCT-3' (reverse). An initial denaturation of 3 min at 94°C was followed by 35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 58°C for K-ras / 64°C for PTEN and 30 sec at 72°C for K-ras / 1 min 30 for PTEN, and a final elongation step of 5 min at 72°C. PCR products were cloned in competent *E. coli* using pcDNA3.1/V5-His TOPO TA expression kit (Invitrogen, Burlington, On, Ca) according to the manufacturer's instructions. For sequencing, PCR products were purified with Miniprep purification kit (Qiagen, Mississauga, ON, CA). The sequencing was carried out using automatic sequencers models capillary ABI PRISM 3100 and ABI PRISM 377 in the Laboratory of Synthesis and Analysis of Nucleic Acids at Laval University (Québec, QC).

## 2.3.4 Results

### *Cell morphology and growth*

Early-passage EN-1078D was examined at low and high resolution. Light microscopy revealed small, polygonal cells organized in a pavement-like arrangement (Fig. 1A). The cell line showed no contact inhibition and was characterized by a tendency to pile up (Fig. 1B). The transmission electron microscopy revealed the presence of numerous well-developed microvilli, intracytoplasmic lipid droplets but no desmosomes (Fig. 1C). Only intricate cytoplasmic interdigitations were observed (Fig. 1D).

To address the *in vitro* growth properties of EN-1078D, cells were seeded into culture dishes and counted every 24 hours (Fig. 2). Results showed logarithmic growth for the first 12 days, and we observed that cell growth continued even when cells reached confluency and seemed limited by the exhaustion of the culture media. Presence of floating cells was noted from the day 12 of the experiment but no layer of cells detached from the flasks even when cells reached confluency. The plating efficiency increased (89.5% to 98%) and the population doubling time decreased (17.6 to 13.8 hours) with increasing number of passages.

### ***Molecular characterization of EN-1078D***

To verify the epithelial origin of the cell line, we profiled the expression of cytokeratins. RT-PCR (Reverse-transcriptase polymerase chain reaction) revealed a predominance of the simple epithelial cytokeratins as indicated by the presence of mRNA for cytokeratins 7, 8, 18 and 19 (Fig. 3A). Western Blot analysis confirmed the expression of cytokeratins 18 and 19 (Fig. 3B); no suitable antibody was available to confirm the expression of Ker7 and Ker8 proteins. Stratified-epithelial cytokeratin 5 mRNA was also detected (Fig. 3A). We also examined the expression of other intermediate filaments: as expected, the transcript of a marker of muscle cells, desmin, was not detectable, but mRNA from vimentin, which is overexpressed in cancerous cells, was present (Fig. 3A).

EN-1078D cells were also tested for the presence of estrogen and progesterone receptors. Figure 4A shows the hormonal receptor status of the cell line. RT-PCR and Western Blot revealed the presence of both estrogen receptor alpha and beta. Only low levels of PR-A mRNA and protein are detectable although the EN-1078D cells expressed PR-B mRNA and protein. In an attempt to determine if these steroid hormones receptors were functional, we have subjected EN-1078D cells treated with increasing concentrations of 17  $\beta$ -estradiol and progesterone in phenol-free conditions to MTT proliferation assay. Both estradiol and progesterone could induce the proliferation of EN-1078D cells (Fig. 4B and 4C). This indicates that these receptors are functional in EN-1078D and also suggests that the properties of these cells can be modulated by sex steroids.

In addition, we characterized the presence of chromosomal alterations in EN-1078D cells. Chromosome analysis revealed an aneuploid population with a complete monosomy for the sexual chromosome X in more than 90% of the cells examined (45, X). The presence of a minor population of cells was observed containing 46 chromosomes with a monosomy for the sexual chromosome and a trisomy for the chromosome 17 (46, X-X, +17) (Fig. 5A). The proportion of this second population varied with increasing number of cell passages, from 10% at first passage to 48% after 20 passages.



To confirm the chromosomal complement 45, X, two probes were used: CEP X (DXZ1) and Y (DYZ1) alpha satellite III. The DXZ1 probe, with an emission wavelength in the orange spectrum, hybridizes to the satellite DNA localized in the centromere of the X chromosome, while the DYZ1 probe, with an emission wavelength in the green spectrum, hybridizes to the satellite DNA III localized in Yq12 locus (Fig. 5B). The results showed only one positive signal in each 988 interphasic cells analyzed. No green signal was obtained indicating that Y chromosome was not present. Figure 5C shows an interphasic hybridization carried out with a probe located on the long arm of chromosome 17q11.2q12 called Her-2/neu. To determine the number of copies of the Her-2/neu gene present in this cancer cell line, we used a probe marked with a fluorescent protein emitting in the orange spectrum which covers the complete Her-2/neu gene as well as a probe marked with fluorescent protein emitting in the green spectrum hybridizing to the satellite DNA in the centromere of chromosome 17. The analysis of 1000 cells showed that only one copy of this gene was present in chromosome 17, indicating no amplification of Her-2/neu gene in EN-1078D cells: a low level of amplification range is between 2 and 4 signals/centromere [27]. We have found, however, other types of mutations in this cell line: sequencing revealed two sites of mutations in PTEN gene. Codon 275 is mutated by addition of a nucleotide and codon 367 replaces a valin for isoleucin. In addition, K-Ras gene analysis showed the classical G to T transversions in the codon 12 (data not shown).

### ***Chemosensitivity of EN-1078D cell line***

We have examined the resistance of EN-1078D to two chemotherapeutic agents currently used for the treatment of endometrial carcinoma, cisplatin and doxorubicin, using the MTT proliferation assay. Two other cell lines were used as a reference: HeLa, a cervical cancer cell line that we showed to be sensitive to these anticancer agents, and KLE, an endometrial cancer cell line known to be chemoresistant [28]. Even after a short exposure of 24 hours to cisplatin, EN-1078D cells were more sensitive than both HeLa and KLE (Fig. 6A-C). EN-1078D cells reached IC50 at 2.8  $\mu$ M of cisplatin after 72 hours of exposure comparatively at 6.7  $\mu$ M for HeLa while KLE cells showed 30% of

growth-inhibition in the same conditions. In the case of doxorubicin, 48h of exposure were required for EN-1078D cells to be growth-inhibited and reached IC<sub>50</sub> to 0.5  $\mu$ M of this compound; HeLa and KLE cells were more resistant to the effects of doxorubicin than EN-1078D cells (Fig. 6D-F) with a IC<sub>50</sub> of 0.6  $\mu$ M for HeLa after 48 hours of exposition and for 1.4  $\mu$ M for KLE after 72 hours. Altogether these results indicate that EN-1078D cells are sensitive to the cytotoxicity of cisplatin and doxorubicin (Fig. 6F).

In order to test the tumorigenic potential of EN-1078D *in vivo*, we performed subcutaneous xenograft experiments in nude mice. All mice developed palpable tumors, and about 8 weeks after inoculation, the tumor size had reached a volume of 350 mm<sup>3</sup> or more (Fig. 7A). The encapsulated tumors were compact in periphery with a liquefied center. Histologic analysis of tumors showed no specific organisation pattern of tumor cells nor observable structures like basal lamina (Fig. 7B). These results indicate that EN-1078D cells are tumorigenic and can therefore be used for *in vivo* tumor growth experiments. No macroscopic metastases were visible in spleen, lungs or liver up to eight weeks post-xenograft. On the other hand, EN-1078D showed 2 fold increase of total number of the invasive cells when the cells were treated with TGF- $\beta$ 3[29] (fig. 8A) after 24 hours of invasion assays. Together, these results confirm that EN-1078D cells constitute an excellent *in vitro* model to characterize the molecular and cellular mechanisms involved in the invasive phenotype of endometrial carcinoma cells.

Constitutive expression and activity of MMPs increases the invasiveness of various types of cancer cells, and we have determined characterized the expression of MMP-2, MMP-9 and MMP-14 as well as TIMP-1 and TIMP-2 mRNA in EN-1078D cells, using RT-PCR (Fig. 8A and B). We found elevated levels of MMP-2 and its physiological activator, MMP-14 mRNAs (Fig. 8B), and low levels of their inhibitor TIMP-2 mRNA (Fig. 8C). As expected, we found that MMP-9 mRNA was not expressed constitutively (Fig. 8A), suggesting that external stimuli, such as contact with matrix protein in Matrigel, for instance, are required to induce the expression of the enzyme. Low levels of TIMP-1 transcript were found in EN-1078D cells (Fig. 8C).

### 2.3.5 Discussion

The present study describes the characterization of a new poorly differentiated endometrial carcinoma cell line, EN-1078D, isolated from a metastasis to the ovary. Although many endometrial carcinoma cell line have demonstrated their capacities to form tumors and/or metastases in nude mice (Hec-1-A, Hec-1-B, RL-95-2 and Ishikawa) [30-32], only few endometrial cancer cell lines derived directly from metastatic cancer cells (AN<sub>3</sub>CA and KLE) [33;34].

We have confirmed the origin of simple epithelial cells [35] for this cell line and the endometrial carcinoma phenotype of the metastatic tumor cells because the EN-1078D cell line was isolated from a ovary. In addition, EN-1078D analysis revealed the presence of two cell populations in this cell line which is often the case in cultures derived from tissues. The presence of only one chromosome X in both populations of EN-1078D cell line confirmed the same origin for these two populations. The differentiation in two types of cell populations by the achievement of the third chromosome 17 was the fact of malignant transformation which seems to give an advantage for *in vitro* growth to this cellular population compared to the other one [36;37]. In addition, we have tested the response of EN-1078D cells to two chemotherapeutic agents commonly used: cisplatin and doxorubicin. In fact, with his high FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) grade (III), his poor differentiation and his aggressiveness, it is surprising that this cell line is so sensitive to these compounds. It is suggested that the karyotypes of the cultured cells may undergo considerable changes *in vitro* and some of these changes may represent the malignant transformation process of the tumor cells *in vivo* [35;36].

Sex steroid receptors status is crucial in the development of endometrial cancer. EN-1078D cells show all functional sex steroid receptors except for PR-A, which is not expressed. Expression of PR-B alone, a strong regulator of proliferation [8;38], is only seen in tumor cells [39] and was a feature of high-grade tumors. A study by Fujimoto and Ichigo [40] has reported that in all metastatic lesions of uterine endometrial cancers, the expression of PR-A mRNA was suppressed and PR-B mRNA was dominantly

expressed which are in correlation with our observations. Additionally, the presence of the both ER $\alpha$  and ER $\beta$  in EN-1078D cells confirm that this cell line will become a very interesting tool of study because the majority of endometrial cancer cell lines available express only one of these two receptors.

Loss of progesterone responsiveness in endometrial cancer [41] combined with the expression of some MMPs might be related to the metastatic potential of EN-1078D cells. The level expression of MMP-2, MMP-14 and TIMP-2 in EN-1078D cell line is consistent with an endometrial cancer with high invasive potential [42]. The team of Graesslin [43] has found a relation between low TIMP-2 expression and myometrial invasion, lymphovascular space involvement, and lymph node metastasis. MMP-9 is normally induced under conditions that require tissue remodelling [44] and is predominantly expressed by inflammatory cells of the stroma [45]. EN-1078D cells do not express MMP-9 in basal and normal culture conditions but they may produce the enzyme in other, more physiological, conditions. Given that this cell line express constitutive levels of MMP-2 and MMP-14, and that EN-1078D cells were highly invasive *in vitro*, this cell line represent an important tool for the characterization and the study of the molecular and cellular mechanisms regulating endometrial carcinoma cell invasion.

In endometrial cancers, frequents lesions were observed including K-Ras and PTEN mutations and Her-2/neu amplification [46]. Our finding that K-Ras is mutated in EN-1078D cell line is supported by many studies suggesting that the majority of mutations present in the codon 12 of K-Ras and G to T transversions were predominating in the North American population [47]. Mutations of the Ras oncogene results in autonomous cell growth [48] by enhancing estrogen and antiestrogen (tamoxifen)-induced transcriptional activity of the ER activation function [49;50]. A significant correlation was found between ER-dependent PR expression and activating K-Ras mutations suggesting that enhanced activity of the ER activation function by stimulating phosphorylation mediated through mutational activation of the Ras-MAPK cascade may be one mechanism of hormone independence of endometrial cancer [51].

PTEN gene is frequently mutated in endometrial cancer. We have identified to 2 sites of mutations in EN-1078D cells affecting the C-terminal domain. This domain, in which  $\geq 43\%$  of PTEN mutations occur, contains many important subdomains that are common to other signal-transducing molecules [52]. The C2 domain (amino acids 186-351) is associated with phospholipids-binding regions [53] and has been identified in many proteins involved in signal transduction and membrane localization [54]. The C-terminal tail also contains a sequence rich in proline, glutamic acid, serine and threonine (PEST sequence) (amino acids 350-375 and 379-396), which are critical for PTEN stability [55]. PEST sequences target proteins for short intracellular half-lives and protein degradation. Paradoxically, deletion of these regions leads to decreased protein expression versus the expected increase. Nonetheless, these studies point out that the PEST regions are necessary for PTEN stability and in EN-1078D cell line the PEST region contains one mutation. PTEN antagonizes the PI3K/Akt pathway by dephosphorylating PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate), resulting in a decreased translocation of Akt to cellular membranes and subsequent down-regulation of Akt activation. It has been shown that expression of PTEN in cells leads to decreased levels of phospho-Akt (active form), and, therefore, to increased apoptosis [56;57]. For example, RL-95-2 and Ishikawa endometrial cancer cells lines have a mutation in the PTEN gene and express high levels of phospho-Akt [58-60]. However, the mutated PTEN-cell line EN-1078D express weak levels of phospho-Akt (data not shown) which suggests that the simple mutation of PTEN in this cell line is not sufficient to induce constitutive Akt phosphorylation.

In conclusion, our results suggest that EN-1078D cell line is an endometrial carcinoma originating from simple epithelial cells. This tumorigenic cell line, positive for both estrogen receptor isoforms and progesterone receptor B, presents mutations in PTEN and K-Ras genes, one tumor suppressor and one oncogene frequently mutated in endometrial cancers. Moreover, EN-1078D expresses high level of MMP-2, no MMP-9 and a weak expression of TIMP-2. These cells express weak levels of phosphorylated Akt and show sensitivity to drugs commonly used in chemotherapy. EN-1078D cell line showed tumorigenic capacities *in vivo* and is a very aggressive cell line with high

invasiveness *in vitro*. EN-1078D will be a useful tool to study the mechanisms involved in the invasion of endometrial cancer cells, and their regulation by sex steroids.

### **2.3.6 Acknowledgments**

The authors thank Mme Lise Porteland for the derivation of the cell line, Dr Agnès Lejeune for her assistance with transmission electron microscopy, Dr Dominique Bérubé for the cytogenetic analysis. This work has been supported by a grant from CIHR (MOP-66987). Eric Asselin holds a New Investigator award of the Canadian Institute of Health Research of Canada (CIHR) and is a chairholder of the Canada Research Chair in Molecular Gyneco-Oncology. Marie-Claude Déry is recipient of an NSERC scholarship and Céline Van Themsche recipient of an FRSQ fellowship.

### 2.3.7 Reference List

1. Rose PG: Endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 1996, 335:640-649.
2. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ: Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004, 54:8-29.
3. Cooper D, Schermer A, Sun TT: Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications, and limitations. *Lab Invest* 1985, 52:243-256.
4. Omary MB, Ku NO, Liao J, Price D: Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem* 1998, 31:105-40.:105-140.
5. Markman M: Hormonal therapy of endometrial cancer. *Eur J Cancer* 2005, 41:673-675.
6. Kato H, Kato S, Kumabe T, Sonoda Y, Yoshimoto T, Kato S, Han SY, Suzuki T, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C: Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. *Clin Cancer Res* 2000, 6:3937-3943.
7. Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, Khatun S, Toyoki H, Tamaya T: Steroid receptors and metastatic potential in endometrial cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000, 75:209-212.
8. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP: Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993, 7:1244-1255.
9. Curry TE, Jr., Osteen KG: The matrix metalloproteinase system: changes, regulation, and impact throughout the ovarian and uterine reproductive cycle. *Endocr Rev* 2003, 24:428-465.
10. Goldman S, Shalev E: The role of the matrix metalloproteinases in human endometrial and ovarian cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003, 111:109-121.
11. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ: Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001, 33:960-970.

12. Aglund K, Rauvala M, Puistola U, Angstrom T, Turpeenniemi-Hujanen T, Zackrisson B, Stendahl U: Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol Oncol* 2004, 94:699-704.
13. Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC: PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res* 1997, 57:4736-4738.
14. Risinger JF, Maxwell GF, Chandramouli GF, Jazaeri AF, Aprelikova OF, Patterson TF, Berchuck AF, Barrett JC: Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer.
15. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, Li J, Parsons R, Ellenson LH: Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 1997, 57:3935-3940.
16. Levine RL, Cargile CB, Blazes MS, van Rees B, Kurman RJ, Ellenson LH: PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma. *Cancer Res* 1998, 58:3254-3258.
17. Sherman ME: Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Mod Pathol* 2000, 13:295-308.
18. Graziano SL, Gamble GP, Newman NB, Abbott LZ, Rooney M, Mookherjee S, Lamb ML, Kohman LJ, Poiesz BJ: Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999, 17:668-675.
19. Choudhury A, Kiessling R: Her-2/neu as a paradigm of a tumor-specific target for therapy. *Breast Dis* 2004, 20:25-31.:25-31.
20. Hetzel DJ, Wilson TO, Keeney GL, Roche PC, Cha SS, Podratz KC: HER-2/neu expression: a major prognostic factor in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1992, 47:179-185.
21. Lazar E, Tudose N, Lazar DC: Prognostic significance of c-erbB2 protein in endometrial cancer. *Rom J Morphol Embryol* 1998, 44:101-107.
22. Rolitsky CD, Theil KS, McGaughy VR, Copeland LJ, Niemann TH: HER-2/neu amplification and overexpression in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1999, 18:138-143.



23. Lounis H, Provencher D, Godbout C, Fink D, Milot MJ, Mes-Masson AM: Primary cultures of normal and tumoral human ovarian epithelium: a powerful tool for basic molecular studies. *Exp Cell Res* 1994, 215:303-309.
24. Mobus VJ, Gerharz CD, Weikel W, Merk O, Dreher L, Kreienberg R, Moll R: Characterization of a human carcinosarcoma cell line of the ovary established after in vivo change of histologic differentiation. *Gynecol Oncol* 2001, 83:523-532.
25. Yamada T, Ueda M, Maeda T, Okamoto Y, Miyawaki Y, Otsuki Y, Ueki M, Sugimoto O: Establishment and characterization of CA 125 producing cell line (OMC-2) originating from a human endometrial adenocarcinoma. *Asia Oceania J Obstet Gynaecol* 1989, 15:403-416.
26. Geran R.I. GNHMMMSAMaBJA: Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Third Edition* 1972, 1-87.
27. Cianciulli AM, Guadagni F, Marzano R, Benevolo M, Merola R, Giannarelli D, Marandino F, Vocaturo G, Mariani L, Mottolese M: HER-2/neu oncogene amplification and chromosome 17 aneusomy in endometrial carcinoma: correlation with oncoprotein expression and conventional pathological parameters. *J Exp Clin Cancer Res* 2003, 22:265-271.
28. Gagnon V, Mathieu I, Sexton E, Leblanc K, Asselin E: AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol Oncol* 2004, 94:785-795.
29. Van Themsche C, Mathieu I, Parent S, Asselin E: Transforming growth factor-beta3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis and protein kinase c-dependent induction of matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 2007, 282:4794-4802.
30. Kuramoto H, Tamura S, Notake Y: Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1972, 114:1012-1019.
31. Nishida M: The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell* 2002, 15:104-117.
32. Way DL, Grosso DS, Davis JR, Surwit EA, Christian CD: Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture. *In Vitro* 1983, 19:147-158.

33. DAWE CJ, BANFIELD WG, MORGAN WD, SLATICK MS, CURTH HO: GROWTH IN CONTINUOUS CULTURE, AND IN HAMSTERS, OF CELLS FROM A NEOPLASM ASSOCIATED WITH ACANTHOSIS NIGRICANS. *J Natl Cancer Inst* 1964, 33:441-56.:441-456.
34. Richardson GS, Dickersin GR, Atkins L, MacLaughlin DT, Raam S, Merk LP, Bradley FM: KLE: a cell line with defective estrogen receptor derived from undifferentiated endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1984, 17:213-230.
35. Lane EB, Alexander CM: Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin Cancer Biol* 1990, 1:165-179.
36. Atkin NB: Modal DNA value and chromosome number in ovarian neoplasia. A clinical and histopathologic assessment. *Cancer* 1971, 27:1064-1073.
37. Kunzmann R, Holzel F: Karyotype alterations in human ovarian carcinoma cells during long-term cultivation and nude mouse passage. *Cancer Genet Cytogenet* 1987, 28:201-212.
38. Gao J, Mazella J, Tang M, Tseng L: Ligand-activated progesterone receptor isoform hPR-A is a stronger transactivator than hPR-B for the expression of IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein-1) in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 2000, 14:1954-1961.
39. Arnett-Mansfield RL, deFazio A, Wain GV, Jaworski RC, Byth K, Mote PA, Clarke CL: Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium. *Cancer Res* 2001, 61:4576-4582.
40. Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T: Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997, 62:449-454.
41. Underhill C: CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci* 1992, 103:293-298.
42. Ferguson SE, Olshen AB, Viale A, Awtrey CS, Barakat RR, Boyd J: Gene expression profiling of tamoxifen-associated uterine cancers: evidence for two molecular classes of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004, 92:719-725.
43. Graesslin O, Cortez A, Uzan C, Birembaut P, Quereux C, Darai E: Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. *Int J Gynecol Cancer* 2006, 16:1911-1917.

44. Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P: Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004, 49:179-186.
45. Graesslin O, Cortez A, Fauvet R, Lorenzato M, Birembaut P, Darai E: Metalloproteinase-2, -7 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 expression in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium: a clinical-pathological correlation study. *Ann Oncol* 2006, 17:637-645.
46. Deligdisch L, Holinka CF: Endometrial carcinoma: two diseases? *Cancer Detect Prev* 1987, 10:237-246.
47. Cho JY, Kim JH, Lee YH, Chung KY, Kim SK, Gong SJ, You NC, Chung HC, Roh JK, Kim BS: Correlation between K-ras gene mutation and prognosis of patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 1997, 79:462-467.
48. Barbacid M: ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987, 56:779-827.:779-827.
49. Bunone G, Briand PA, Miksicek RJ, Picard D: Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 1996, 15:2174-2183.
50. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P: Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995, 270:1491-1494.
51. Niederacher D, An HX, Cho YJ, Hantschmann P, Bender HG, Beckmann MW: Mutations and amplification of oncogenes in endometrial cancer. *Oncology* 1999, 56:59-65.
52. Waite KA, Eng C: Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet* 2002, 70:829-844.
53. Lee JO, Yang H, Georgescu MM, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon JE, Pandolfi P, Pavletich NP: Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 1999, 99:323-334.
54. Rizo J, Sudhof TC: C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain. *J Biol Chem* 1998, 273:15879-15882.

55. Georgescu MM, Kirsch KH, Akagi T, Shishido T, Hanafusa H: The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96:10182-10187.
56. Davies MA, Lu Y, Sano T, Fang X, Tang P, LaPushin R, Koul D, Bookstein R, Stokoe D, Yung WK, Mills GB, Steck PA: Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res* 1998, 58:5285-5290.
57. Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der KJ, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK: The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor supressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:13513-13518.
58. Gagnon V, St Germain ME, Parent S, Asselin E: Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1. *Int J Oncol* 2003, 23:803-810.
59. St Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E: Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer* 2004, 3:7.:7.
60. St Germain ME, Gagnon V, Mathieu I, Parent S, Asselin E: Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int J Oncol* 2004, 24:1311-1324.

### 2.3.8 Figure legends

**Figure 1:** A) Phase contrast features of the monolayer-cultured EN-1078D cells revealing a sheet of polygonal cells with a pavement-like arrangement. B) Transmission electron microscopy showing the tendency of cells to pile up. C) Ultrastructural aspects of EN-1078D cell line by transmission electron microscopy. Cultured cells show a high nucleus-cytoplasmic ratio, euchromatic nuclei, prominent nucleoli and well-developed microvilli. D) Higher magnification shows intracytoplasmic lipid droplets (L), and exhibits intricate cytoplasmic interdigitations but no desmosomes were observed.

**Figure 2:** Growth curves and characteristics of EN-1078D.

**Figure 3:** Expression of cytokeratins in EN-1078D. A) RT-PCR analysis for stratified-, simple-epithelial cytokeratins and for the other types of intermediate filaments. In EN-1078D cells, the simple-epithelial cytokeratins are predominantly expressed. Vimentin expression is consistent with the neoplastic tissue while absence of the expression of desmin confirmed that EN-1078D is not an endometrial sarcoma. B) Expression of cytokeratins 18 and 19 by Western Blot analysis.. KLE was used like as positive control. Data shown are representative of results obtained from three independent assays.

**Figure 4:** Sex steroid receptor status. A) Both estrogen and progesterone receptors mRNA are detected by RT-PCR but the signal for PR-A is very weak and protein is not detected by Western blot analysis. Ishikawa cell line was used as a positive control for PRA-B antibody. Data shown are representative of results obtained from three independent assays. MTT proliferation assay was conducted to verify the functionality of these receptors in EN-1078D cell line: B) 24 hours of exposure to  $17\beta$ -oestradiol increases cell growth and C) a significant increase in proliferation was observed after 48 hours of exposure to  $10^{-6}$ M for progesterone ( $p < 0.05$ ). Data shown are representative of results obtained from three independent assays.

**Figure 5:** A) Karyotype analysis of EN-1078D (P76+13 passages), showing that all cells have monosomy of X chromosome. Most of the cells have trisomy of chromosome

17.B) FISH analysis of copy number of X chromosome with Probe CEP X (DXZ1) alpha satellite III. Probe DXZ1 marked in orange spectrum hybrid satellite DNA localized in the centromere of the X chromosome. Only one X chromosome per cell was observed. C) Metaphasic analysis of Her2/neu (human epidermal growth factor receptor 2) by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). The HER-2 probe spans the entire HER-2 gene is labeled in spectrum orange. The CEP 17 probe is labeled in spectrum green and hybridizes to the alpha satellite DNA located at the centromere of chromosome 17 (17p11.1-q11.1). Inclusion of the CEP 17 probe allows for the relative copy number of the HER-2 gene to be determined.

**Figure 6:** Determination of EN-1078D sensitivity to cisplatin (left panel) and doxorubicin (right panel). A,D) 24 hours of exposure to compounds B,E) 48 hours and C,F) 72 hours. Both Hela and EN-1078D are sensitive to cisplatin after 24 hours in contrast to KLE, which is chemoresistant. The three cell lines seem not to be affected by doxorubicin after exposure of 24 hours. KLE is more resistant than other cells lines for both 48 and 72 hours. Data shown are representative of results obtained from three independent assays.

**Figure 7:** A) Tumorigenicity of EN-1078D cells in nude mice. B) Histology of subcutaneous tumor taken from nude mice showed large solid masses composed of poorly differentiated carcinoma cells with no apparent structures (haematoxylin, 40X)

**Figure 8:** Invasion assay and expression of MMPs and TIMPs mRNA in EN-1078D. A) EN-1078D cells showed capacities to increase their invasiveness by 2 fold induction when they were stimulated with TGF- $\beta$ 3. B) The cell line expresses MMP-2 and 14 while MMP-9 was not detected. The signal for MMP-2 is stronger for EN-1078D cells than for the positive control used. C) Both TIMPs expressions were detected but TIMP-2 signal is weak. Data shown are representative of results obtained from three independent assays.

### 2.3.9 Tables

**Table 1:** PCR primers, cycling conditions and positive controls used.

\* Size of amplified fragment; \*\* PMA-treated THP-1 cells

Primer	Sens Primer	Antisense Primer	Size (bp)*	annealing (celsius)	cycles	extension	positive control
Keratin 1	5'-gatgaaggccacggtgatca-3'	5'-gacttgagttggggtgccta-3'	627	64	36	1 min	KLE
Keratin 4	5'-ctccagcaaaaaccttgagc-3'	5'-aagtcattctcggctgctgt-3'	186	58	36	30 sec	KLE
Keratin 5	5'-tctgccagctcaagtgtgtc-3'	5'-atagccaccactccacaag-3'	247	58	36	30 sec	KLE
Keratin 7	5'-caggatgtgtggaggactt-3'	5'-ttgtctatgtaggcagcatc-3'	116	58	30	30 sec	KLE
Keratin 8	5'-agatgaaccggaacatcagc-3'	5'-tccagcagcttccttaggt-3'	262	58	30	30 sec	KLE
Keratin 13	5'-gtcttcagcaccagaggag-3'	5'-ttgcagaaggcaggaaaact-3'	246	58	36	30 sec	Hec-1-A
Keratin 18	5'-cacagtctgtgaggttga-3'	5'-gagctgtctccatctgtagg-3'	164	58	36	30 sec	KLE
Keratin 19	5'-ttgagacggaacaggctct-3'	5'-gccatgacctcatattggct-3'	275	58	30	30 sec	KLE
Keratin 20	5'-acgccagaacaagaatacc-3'	5'-acgaccttgccatccactac-3'	198	61	36	30 sec	KLE
Vimentin	5'-gagaactttgccgttgaagc-3'	5'-tccagcagcttccttaggt-3'	170	58	36	30 sec	KLE
Desmin	5'-caagctgcaggaggagattc-3'	5'-ggcagtgaggcttggttag-3'	241	62	36	30 sec	KLE
ER alpha	5'-gtgcctggctagagatcctg-3'	5'-agagacttcagggtgcttga-3'	265	66	36	30 sec	MCF-7
ER beta	5'-tcaggcatgcagtaacaag-3'	5'-gcttttactgtcctctgccg-3'	167	65	36	30 sec	MCF-7
PR-A	5'-gcttcaagttagccaagaagagt-3'	5'-ctggaaattcaacactcagtg-3'	290	58	36	30 sec	Ishikawa
PR-B	5'-acaccttgctgaagtttcg-3'	5'-tccaagacactgtccagcag-3'	160	64	35	30 sec	Ishikawa
MMP-2	5'-aggcaagtgtccgtgtgaa-3'	5'-acagtggaatggcggtctcag-3'	369	66	36	30 sec	KLE
MMP-9	5'-caacatcacctattggatcc-3'	5'-cgggtgtagagtcctcgtct-3'	479	60	36	30 sec	KLE
MMP-14	5'-ccagggtctcaaatggcaaca-3'	5'-ccatggaagccctcggcaaa-3'	219	66	36	30 sec	**
TIMP-1	5'-accagaccaccttataaccagc-3'	5'-ggactggaagcccttttcagag-3'	395	58	36	30 sec	RL-95-2
TIMP-2	5'-atgcagatgtagtatcagggc-3'	5'-gatgaagtcacagagggtgatg-3'	272	58	36	30 sec	RL-95-2
β-actin	5'-gaggatcttcatgaggtagtctgtcaggtc-3'	5'-caactgggacgacatggagaagatctggca-3'	348	58	25	30 sec	none

## 2.3.10 Figures

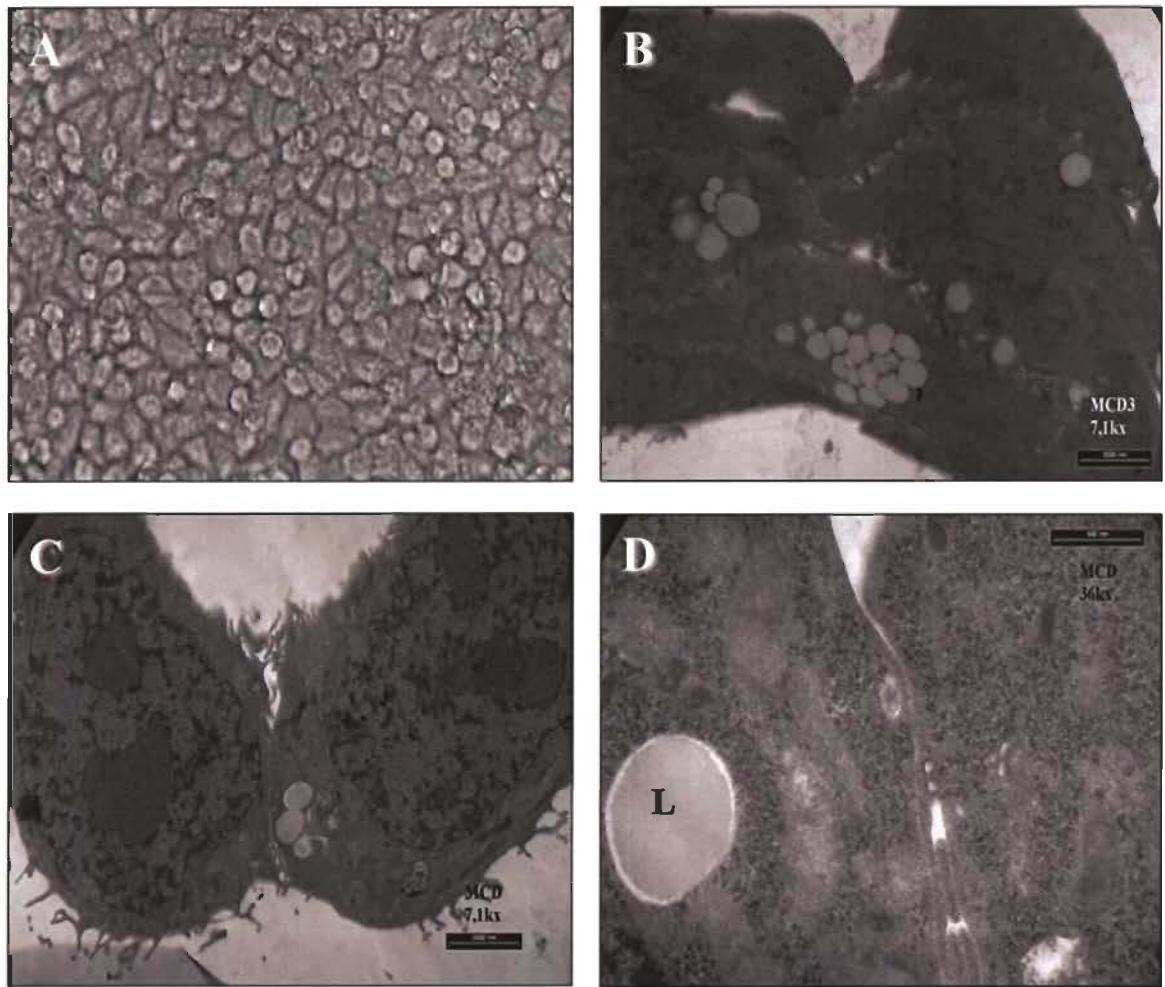


Figure 1: Dery et al.



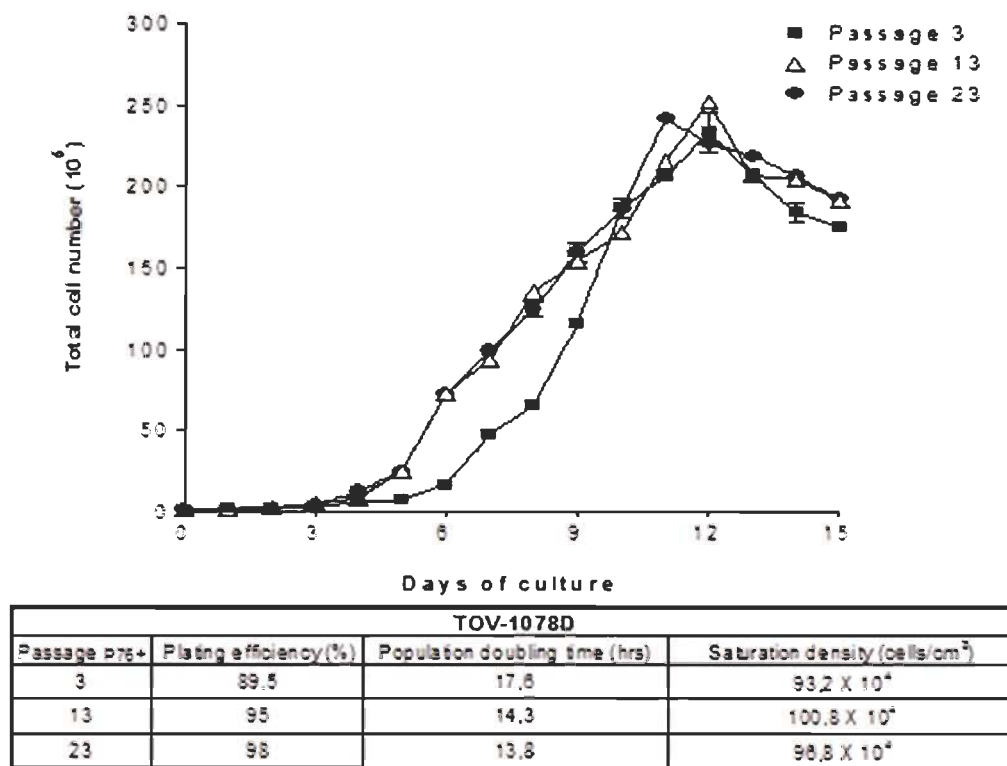


Figure 2: Dery et al.

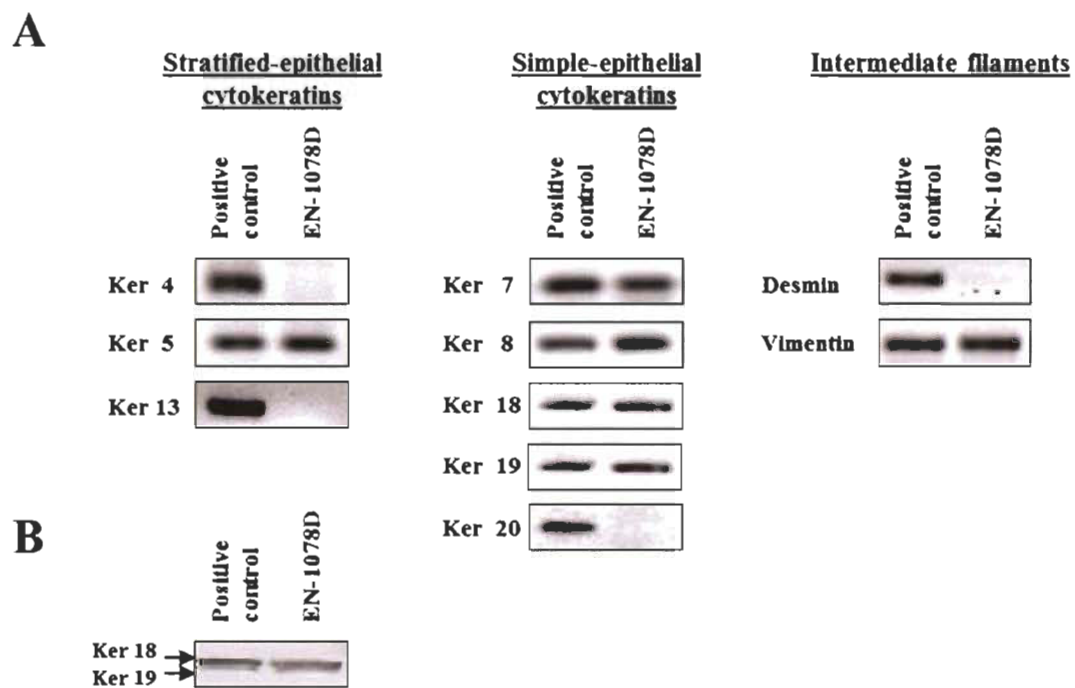


Figure 3: Dery et al.

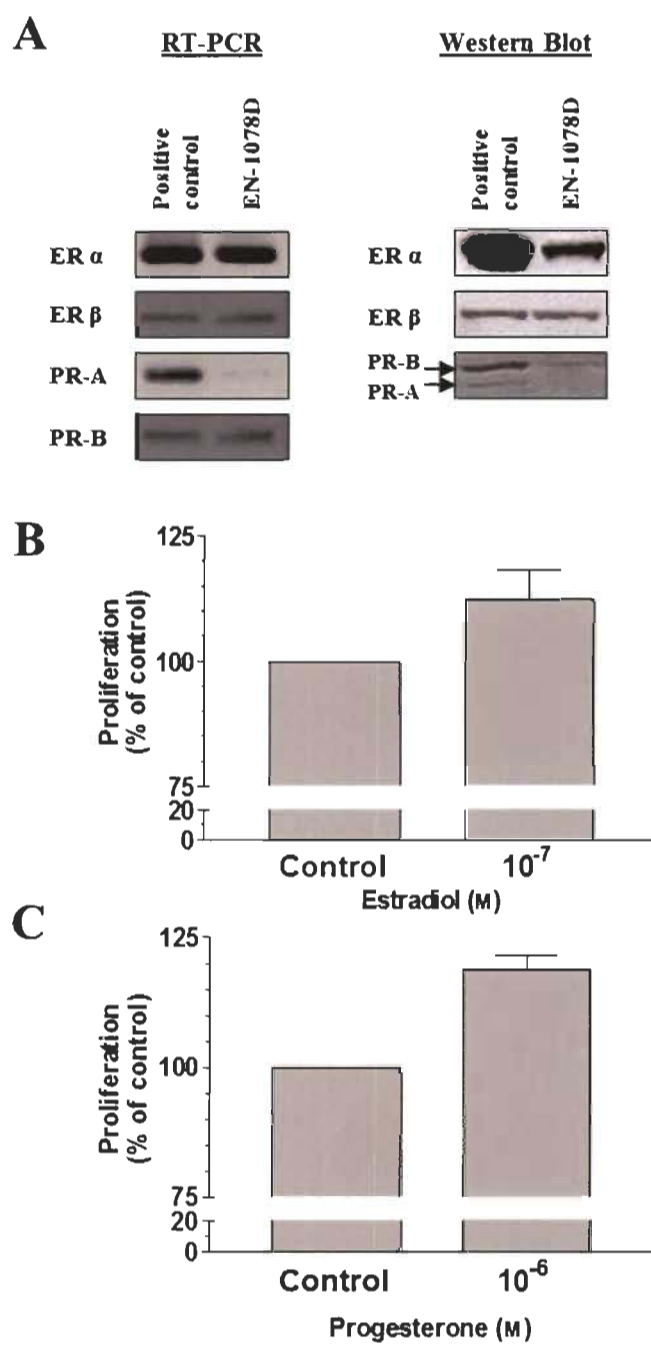


Figure 4: Dery et al.

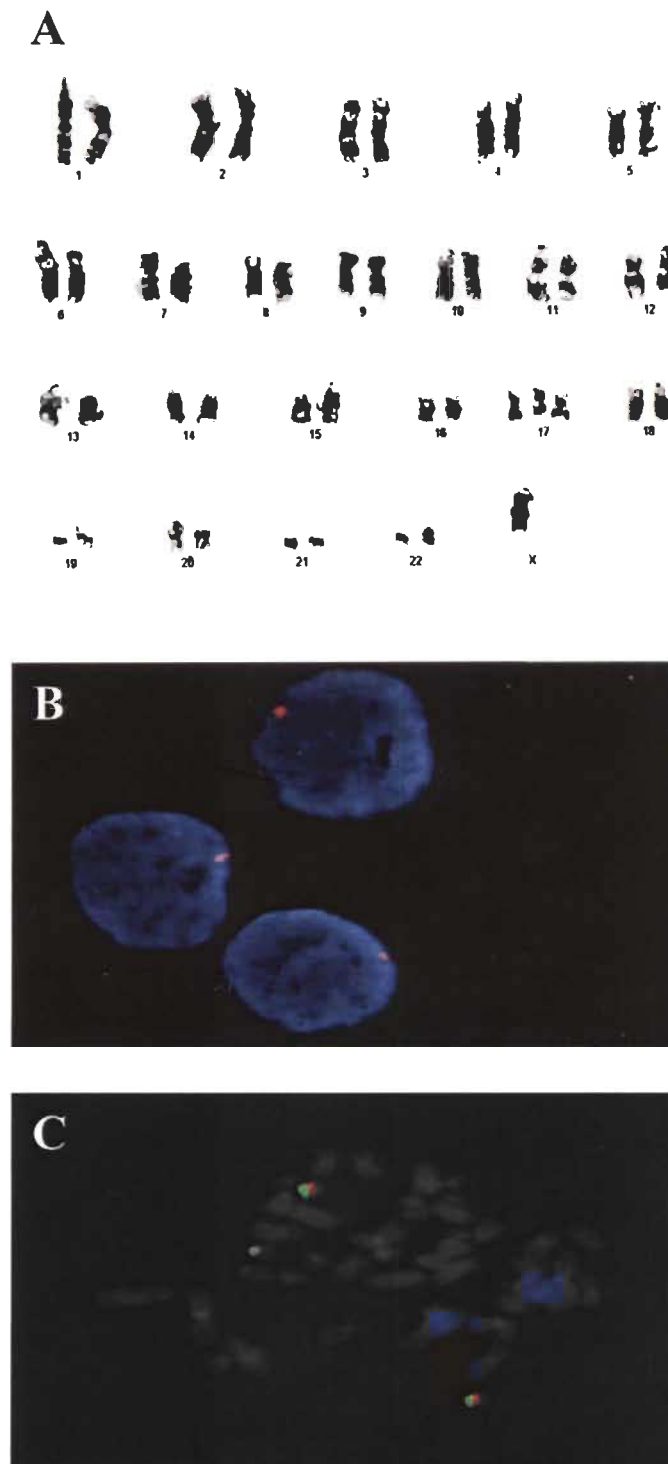


Figure 5: Dery et al.

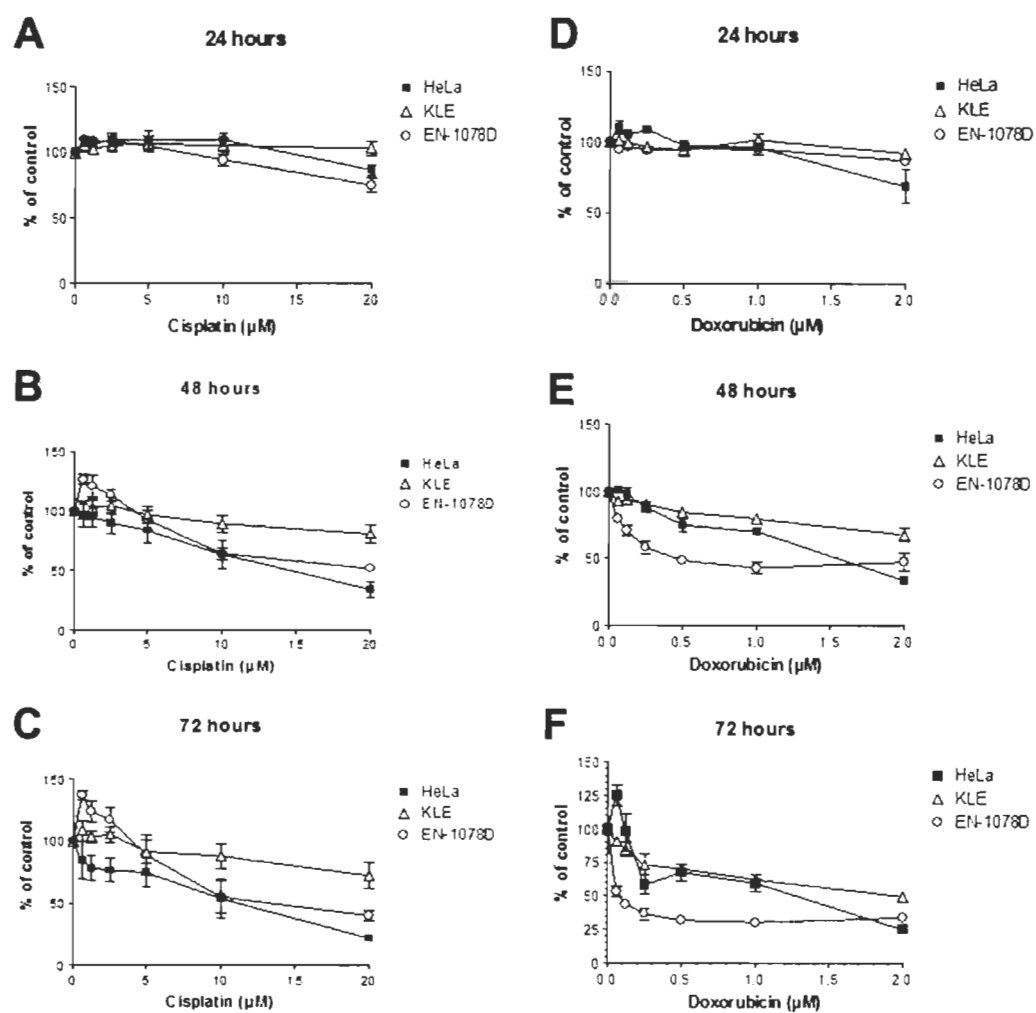


Figure 6: Dery et al.

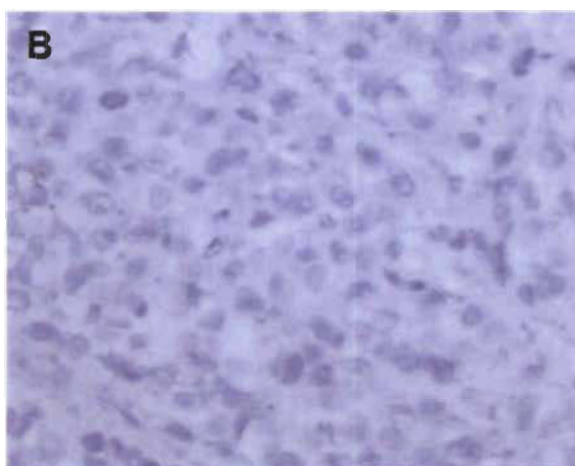
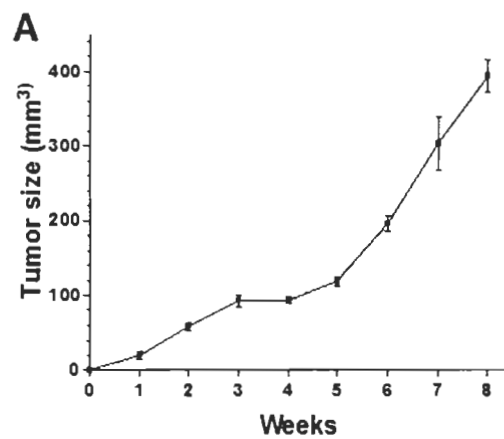


Figure 7: Dery et al.

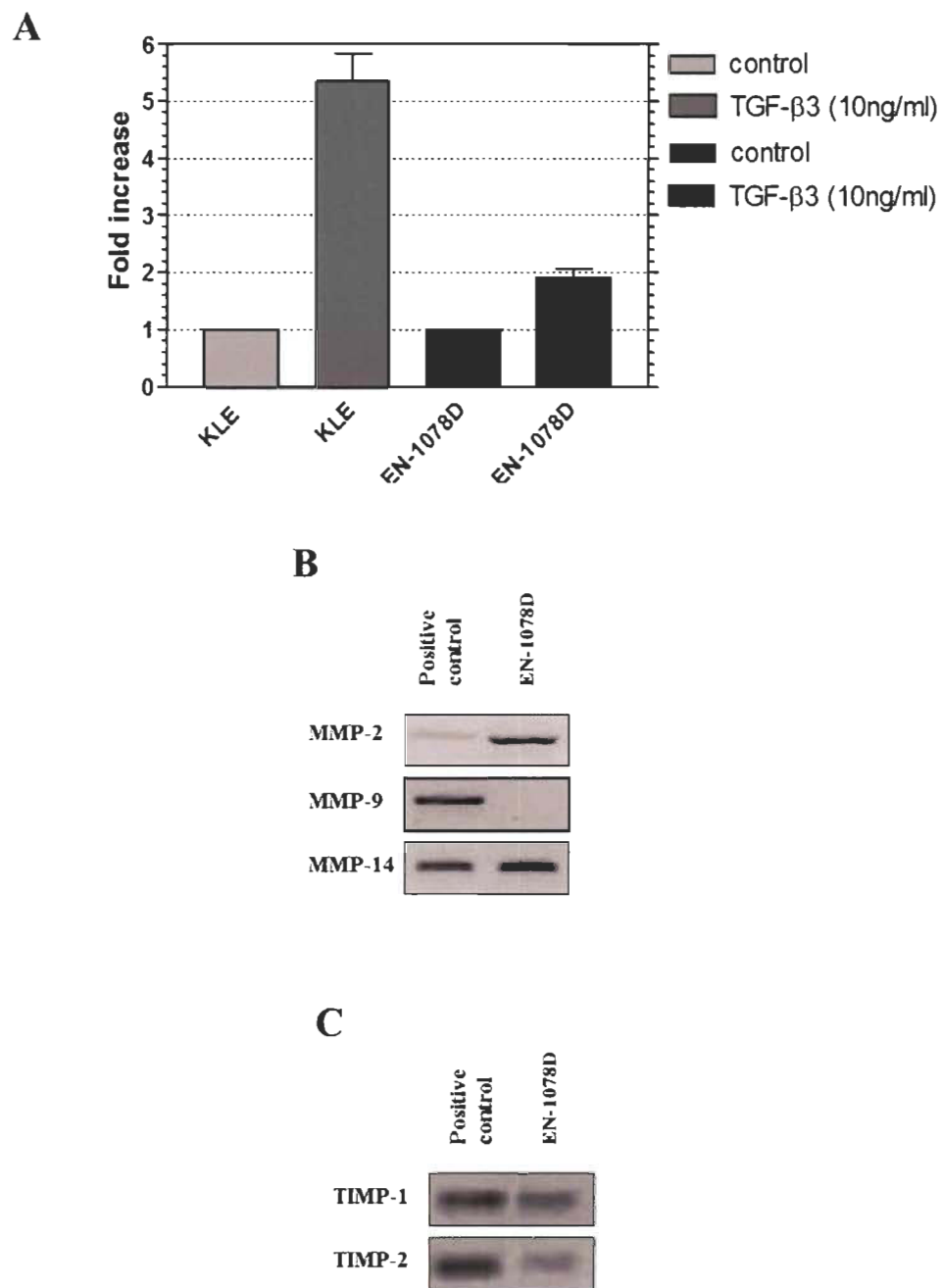


Figure 8: Dery et al.

## **CHAPITRE III**

### **OXYTOCIN INCREASES INVASIVE PROPERTIES OF ENDOMETRIAL CANCER CELLS THROUGH PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE/AKT- DEPENDENT UP-REGULATION OF CYCLOOXYGENASE-1, -2 AND X- LINKED INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEIN**

Ce chapitre est présenté sous forme d'article, en anglais, et a été publié dans la revue *Biology of Reproduction*, 2011, Dec; 85(6) : 1133-42

#### **3.1 Contribution des auteurs**

L'ensemble des expérimentations à la base de cet article a été effectué par Marie-Claude Déry qui a fait le design et l'écriture de l'article ainsi que toutes les expériences hormis ceux en lien avec la lignée Ishikawa et shRNA de COX-2 qui ont été exécutés par le Dr Parvesh Chaudhry alors que Sophie Parent a exécuté le dosage de la PGE<sub>2</sub>, Valérie Leblanc et Anne-Marie Fortier ont apporté de l'aide technique. Le manuscrit a été révisé et corrigé par les Dr Parvesh Chaudhry et Dr Eric Asselin, directeur de recherche. Dr Asselin a également contribué à la planification des expériences et l'encadrement des travaux.

#### **3.2 Résumé**

L'ocytocine est traditionnellement connue pour jouer un rôle dans la régulation des changements cycliques à survenir au niveau de l'utérus, dans l'implantation de l'embryon et dans la parturition. Récemment, il a été démontré que l'ocytocine pouvait agir à titre de régulateur de la prolifération cellulaire dans plusieurs types de cancer. Dans les cellules du carcinome endométrial, il a été rapporté que l'ocytocine inhibait efficacement la prolifération cellulaire. Dans cette étude, nous démontrons que l'ocytocine peut induire l'invasion des cellules du carcinome endométrial humain qui



sont également résistantes à l'effet inhibiteur de l'ocytocine. À l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, de tests d'invasion, d'analyse de type interférence ARN et d'immunofluorescence, nous avons déterminé que l'ocytocine augmente les propriétés invasives des cellules du cancer endométrial via l'augmentation de l'expression de XIAP, de la MMP-2 et MMP-14. Nos résultats démontrent que l'invasion est COX-1 et COX-2 dépendante via la voie de PI 3-K/Akt. De plus, l'analyse par interférence ARN de COX-2 a diminué l'expression de XIAP. Nous avons aussi mis en évidence la présence du récepteur OTR dans les grades I à III du cancer endométrial. L'ensemble de nos résultats décrivent pour la première fois un nouveau rôle pour l'ocytocine dans l'invasion des cancers endométriaux.

### 3.3 Article scientifique

#### **Oxytocin Increases Invasive Properties of Endometrial Cancer Cells through Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT-dependent Up-regulation of Cyclooxygenase-1, -2 and X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein**

Marie-Claude Déry, Parvesh Chaudhry, Valérie Leblanc, Sophie Parent, Anne-Marie Fortier and Eric Asselin\*

Research Group in Molecular Oncology and Endocrinology, Department of Chemistry and Biology, Université du Québec à Trois-Rivières, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7;

##### **3.3.1 Abstract**

Traditionally, oxytocin (OT) is well known to play a crucial role in the regulation of cyclic change of the uterus, implantation of the embryo and parturition. Recently, an additional role for OT has been identified in several types of cancer cells where OT acts as a growth regulator. In endometrial cancer cells, OT is known to efficiently inhibit cellular proliferation. In the present study, we show that OT increases invasiveness of human endometrial carcinoma (HEC) cells which are otherwise resistant to the growth-inhibiting effects of OT. Using pharmacological inhibitors, invasion assay, RNA interference and immunofluorescence, we found that OT enhances the invasive properties of HEC cells through up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), matrix-metalloproteinase-2 (MMP2) and matrix-metalloproteinase-14 (MMP14). In addition, we show that OT-mediated invasion is both cyclooxygenase-1 (PTGS1) and cyclooxygenase-2 (PTGS2) dependent via the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT (PI3-K/AKT) pathway. COX-2 knockdown by shRNA resulted in XIAP downregulation. We also show that OT receptor is overexpressed in grade I to III endometrial cancer. Taken together, our results describe for the first time a novel role for OT in endometrial cancer cell invasion.

### 3.3.2 Introduction

Endometrial carcinoma is the fourth commonly diagnosed cancer among women in the Western world [1]. The capacity for invasion and dissemination of tumor cells is a significant turning point in the survival to endometrial carcinoma. Various growth factors, extracellular matrix components (ECM) and tumor-secreted factors are known to stimulate the motility of tumor cells [2].

Oxytocin (OT) is a nonapeptide hormone playing a crucial role in many reproductive and behavioural processes [3]. In recent years, OT has been described to inhibit cell proliferation as well as to promote cell proliferation and invasion depending on cancer cell type [4;5]. OT acts through the activation of a specific membrane G-coupled receptor, the oxytocin receptor (OTR) [6]. The OTR could activate different signal transduction pathways: a) the "traditional" signalling pathway which result in the hydrolysis of phosphatidylinositol and cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  increase [6] leading to transcriptional activity by phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) [7] and extracellular signal-regulated kinases (ERKs) or b) the unconventional pathway through the formation of cAMP resulting in the induction of cyclin kinase inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [4;8].

It has been reported that OT could stimulate prostaglandin E (2) ( $\text{PGE}_2$ ) synthesis in endometrial epithelial cells under physiologic conditions [9;10] as well as in cancer cells [11].  $\text{PGE}_2$ , a cyclooxygenase-2 (PTGS2)-derived eicosanoid, has been shown influence the hallmark of cancer cells by inducing proliferation, survival, angiogenesis, immunosuppression processes, migration and invasion through activating multiple cellular pathways [12-14]. In the current study, we evaluated if OT could modulate invasive properties of HEC cell lines (Hec-1-A and Ishikawa) and investigated the involvement of the PTGS/ $\text{PGE}_2$  and PI3-K/AKT survival pathway in this process.

### 3.3.3 Materials and Methods

#### *Cell line and Reagents*

Hec-1-A cell line was purchased from ATCC ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Hec-1-A cells were derived from a poorly differentiated endometrial carcinoma (grade 3). Cells were maintained in McCoy's 5A media supplemented with 2.438 g/L of NaHCO<sub>3</sub>, 10% of BGS (bovine growth serum) and 50 µg/mL gentamycin. Ishikawa cells were generously provided by Dr. Sylvie Mader (Université de Montréal, Qc, Canada). Ishikawa cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with 2% BGS and 50 µg/mL gentamycin. All of the antibodies were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) except for COX-1 and COX-2 which were purchased from Cayman Chemical (Cedarlane, Burlington, ON, Canada). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies were obtained from Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON, Canada). Antibody for OTR was from Sigma Aldrich (St-Louis, MO) and MMP-14 was from Abcam (Cambridge, MA). Oxytocin, Indomethacin, SB203580, MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazolyl)-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and Hoechst 33258 were obtained from Sigma Aldrich. Prostaglandin E<sub>2</sub>, SC-19220 and NS-398 were purchased from Cayman Chemical. LY294002 and PD98059 were obtained from Cell Signaling Technology. PTGS2 shRNA was purchased from SA Biosciences (Frederick, MD 21703, USA).

#### *Western blot analysis*

Cells were trypsinized, lysed in cold RIPA lysis buffer (PBS 1X pH 7.4; 1% Nonidet P-40; 0.5% Sodium deoxycholate; 0.1% SDS; Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Roche, Indianapolis, IN, USA), frozen and thawed three times, and centrifuged (16,100 g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. Supernatant was recovered and stored at –20°C till further analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay (Bio Rad, Mississauga, ON, CA). Protein extracts (35-50 µg) were denatured (95°C, 3 min) and resolved by 8, 10 or 14% w/v SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by semi-dry electro-transfer to nitrocellulose

membranes (15 V, 30 min) using Bio-Rad apparatus. Membranes were then blocked (1 hr, RT) with PBS 1X-Tween 20 0.06% containing 5% w/v non-fat milk powder, then incubated with primary antibody overnight at 4°C, and subsequently with Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (RT, 45 min) or with HRP-conjugated anti-mouse secondary antibody (RT, 45 min). Peroxidase activity was visualized with the SuperSignal West Femto substrate (Pierce, Arlington Heights, IL), according to the manufacturer's instructions

### ***MTT Proliferation Assay***

Cells were plated at a density of  $1.5 \times 10^4$  cells / well in 96-wells plates and incubated overnight at 37°C until they reached 80% confluence. Cells were cultured for 24, 48 and 72 h in the presence of increasing concentrations of OT (0; 0.01; 0.1; 1 and 10  $\mu$ M in culture media) at 37°C. MTT reagent (Sigma) was added to the wells (10  $\mu$ L of a 5 mg/mL thiazolyl blue tetrazolium bromide in PBS) 3.5 h before the end of the incubation period. The conversion of yellow tetrazolium salt to blue thiazol crystals by metabolically active cells was stopped by adding 100  $\mu$ L of solubilization solution (10% w/v SDS in 0.01 M HCl) in each well. The microplate was incubated overnight (37°C, 5% CO<sub>2</sub>/air) to allow the complete solubilization of thiazol crystals. The optical density (OD) of blue emission (600 nm) was read with the FluoStar Optima reader (BMG Laboratories, Durham, NC). Percentage of proliferating cells was calculated as the ratio of optical densities of treated to control-treated cells. The experiments were repeated 3 times in duplicate.

### ***Invasion assays***

Transwell® Permeable support (Costar 3432, Corning, USA) with an 8.0  $\mu$ m pore size polycarbonate membrane was coated with 2 mg/mL of BD Matrigel Low™, diluted 1:5 in fresh media without serum. The cells were pre-treated for 1h with 20  $\mu$ M of LY294002, 100  $\mu$ M of Indomethacin, 10  $\mu$ M of NS-398, 10  $\mu$ M of SC-19220 or transfected with XIAP siRNA followed by a 24h treatment with 100 nM of PGE<sub>2</sub> or

1  $\mu$ M of OT. After the completion of treatment period, cells were collected, washed, and resuspended in basal medium without serum. The lower chambers were filled with 600  $\mu$ L of respective fresh culture medium containing 5% of bovine growth serum with or without 1  $\mu$ M of OT and  $1 \times 10^5$  cells were added to the upper chamber inserts. The plates were incubated for 24 h, 48 h or 72 h at 37°C. After the incubation period, invasive cells had reached the porous insert, where they adhered. The non-migrated cells on the upper surface of the filter were removed by scraping. Invasive cells were fixed in methanol and nuclear staining was performed with Hoechst 33258 followed by densitometric analysis. The assays were run in duplicate.

### ***PGE<sub>2</sub> enzyme immunoassay***

The procedure for PGE<sub>2</sub> EIA kit (Cayman) described by the manufacturer was followed. Briefly, a 50  $\mu$ L aliquot from culture medium was used for PGE<sub>2</sub> determination in a 96-wells plate coated with goat anti-rabbit secondary antibody. A volume of 50  $\mu$ L of PGE<sub>2</sub> tracer and 50  $\mu$ L of the PGE<sub>2</sub> antibody were added to each sample and the plate was incubated overnight at 4°C. Wells were washed with 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing Tween 20 (0.05%) at pH 7.4; 200  $\mu$ L of Ellman's reagent (69 mM acetylthiocholine and 54 mM 5,5'-dithio-bis [2-nitrobenzoic acid] in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) was added to each well, and samples were incubated in the dark at room temperature. This allows the bound enzyme tracer to react with Ellman's reagent to yield a yellow solution that can be measured photometrically with a microplate reader at 410 nm. A standard curve was developed simultaneously with standards ranging from 50 to 1000 pg/mL of PGE<sub>2</sub>. The presence of PGE<sub>2</sub> was undetectable in the culture media in the absence of cells.

### ***XIAP siRNA***

Cells ( $2 \times 10^6$ ) were seeded in a petri dish to adhere and in order to reach ~80% confluence in 24 h. At the time of experiment, XIAP (5'-ccaagugguaguccguuucagcau-3' and 5'-augcugaacaggacuaccacuugg-3'), or control (5'-acucuaucugcagcgagacuu-3' and 5'-agucagcgugcagauagagu-3') siRNA were mixed with Trans-it TKO transfection

reagent (Mirus, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions and added to the cells for a working concentration of 100 nM. Following 8h of transfection, fresh medium containing 1  $\mu$ M of OT was added and cells were collected after an additional incubation period of 24 h.

### ***PTGS2 shRNA***

One day before transfection, cells ( $0.3 \times 10^6$ ) were seeded in six well culture plates. After 24h, cells were transiently transfected with 1  $\mu$ g PTGS2 shRNA/well using Fugene 6 (Roche, Indianapolis, IN, USA). Following 48h of transfection, medium was replaced with fresh medium containing 1  $\mu$ M OT. Cells were further incubated for 24h. After 24h of OT treatment, cells were harvested for western blot analysis.

### ***Hoechst nuclear staining***

Treated cells were collected, washed and resuspended in 1  $\mu$ g/mL Hoechst 33258 (Sigma) in 10% formalin and incubated for 24 h at 4°C before blind cell counts were performed using a Olympus BX60 fluorescence microscope. At least 300 cells were counted for each sample, and the percentage of apoptotic cells was calculated as the ratio of apoptotic cells (with characteristic apoptotic morphology such as nuclear shrinkage and condensation, as revealed by fluorescence microscopy) to total cell count.

### ***RNA isolation and RT-PCR***

Total RNA was isolated from cells using Trizol Reagent (Invitrogen) as described by the manufacturer. First strand cDNA synthesis was done using 1  $\mu$ g of RNA. Briefly, the RNA samples were incubated (65°C, 10 min) with 2:1 oligo dT (deoxythymidine) primers in a final volume of 10:1. Samples were then incubated (37°C, 60 min) in 20:1 of a reaction buffer 10X containing dithiothreitol (DTT, 100 mM), deoxynucleotide triphosphate (dNTPs, 5 mM) and Muloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV-RT, 200 U). The reaction volumes were brought up to 60:1 with autoclaved water. Each PCR reaction mixture (final volume 50:1) contained 1X Buffer,

RT template or negative control (5:1),  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), dNTPs (5 mM), primers (25pmoles, 1:1 each) and Taq polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ). PCRs were performed in a MJ Research Thermal cycler (model PTC-100) using the following parameters: 30 s at 94 °C, 30 s at  $T_m$  and 30 s to 1 min at 72 °C for 36-40 cycles, except for  $\beta$ -actin (25 cycles).  $T_m$  and primer sequences are given in Table 1. Reaction products were analysed on 1 % w/v agarose gels. Bands were visualized using SYBR-Safe™ (Invitrogen) staining upon ultra-violet transillumination.

### ***Gelatin Zymography***

Serum-free conditioned medium from cells was assessed by zymography for the detection of gelatinolytic enzymes. The samples were applied without heating to a 10% polyacrylamide gel with 0.1% gelatine (Sigma). After electrophoresis, the gels were washed twice for 30 min with 2.5% and 1% Triton X-100 to remove SDS and incubated for 24h in 50 mM Tris, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1% Triton-X at 37°C. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue for 30min and destained in 30% v/v methanol, 5% acetic acid. The gelatinase activity was identified as a clear band on a blue background.

### ***Immunofluorescence-based Detection of OTR in Clinical Samples***

Human endometrial carcinoma tissue section slides (Cybrdi, Frederick, MD), containing 16 grade I tumor specimens, 34 grade II tumor specimens, 5 grade III tumor specimens, 2 smooth muscles and 3 normal endometrial specimens were used. The tissues, obtained from biopsies, were already formalin-fixed and paraffin-embedded. The slides were deparaffinized by heating at 55°C for 30 min followed by two washes in NeoClear solvent (VWR Canlab, Mississauga, Canada) and progressively hydrated with successive washes at room temperature in 100%, 95% and 70% ethanol and two washes in water. After antigen retrieval for 20 min in boiling citrate solution (10 mM sodium citrate pH 6, 0.05% Tween in water), the tissue slides were cooled down for 20min at room temperature and then washed twice in PBS. Nonspecific binding sites were blocked by 1h incubation with 5% normal donkey serum and 0.3% Triton X-100 in PBS



at room temperature in a humidified chamber, and the tissues were probed with rabbit anti-human OTR primary antibody (Sigma-Aldrich) or rabbit IgG isotype control (Vector Laboratories) overnight at 4°C. The slides were washed three times in PBS, and the tissues were probed with Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes) for 1h at room temperature in a humidified chamber protected from light. The slides were washed once in PBS and counterstained with Hoechst nuclear dye followed by two rinses in water. The tissues were mounted with p-phenylenediamine (PPDA) in glycerol and observed under a fluorescence microscope.

### ***Statistical analysis***

All experiments were repeated at least three times. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 3.03; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test. Statistical significance was accepted when  $p < 0.05$ .

### **3.3.4 Results**

#### ***HEC Cells are Resistant to the Growth Inhibitory Effect of OT***

Expression of the OT receptor and the antiproliferative effect of OT in endometrial carcinoma have been reported [15]. We examined whether Hec-1-A and Ishikawa cells expressed the OT receptor and we have evaluated the growth inhibitory effect of OT using MTT proliferation assays. We found that OTR was abundantly expressed (Fig. 1A) in both Hec-1-A and Ishikawa cell lines. Hec-1-A cells did not respond to the growth inhibitory effect of OT even when the concentration of OT was increased up to 10 $\mu$ M or after a prolonged exposure of 72h (Fig. 1B). These results indicate that OT does not affect the proliferation of endometrial carcinoma cells.

### ***Oxytocin Increases Invasion in HEC Cells***

The ability of oxytocin to stimulate motility and invasion had been reported in different cells [16;17]. We have evaluated the effect of OT on the invasiveness of Hec-1-A cells using the Matrigel invasion assay. We found that oxytocin increased Hec-1-A cells invasion (Fig. 1C) by 45% which were poorly invasive in basal conditions. The maximal induction in cell motility was observed with 1  $\mu$ M of OT, therefore, this concentration was then chosen for all subsequent experiments.

### ***OT-mediate Invasion by Up-Regulating PTGS Isoforms and PGE<sub>2</sub> production***

Because PTGS enzymes represent the rate-limiting step in prostaglandin biosynthesis and it is predominantly PGE<sub>2</sub> production that has a strong association with carcinogenesis as well as tumor growth, invasion and metastasis [18;19], we investigated whether OT could stimulate PTGS1, PTGS2 and PGE<sub>2</sub> synthesis in HEC cells. The results showed that oxytocin treatment significantly increased PTGS1 expression (Fig. 2 A-B). Interestingly, PTGS2 which is not detectable or poorly expressed in HEC cells was dramatically up-regulated in both Hec-1-A and Ishikawa cells (Fig. 2 A-D). Lower band in PTGS2 blot (Fig. 2A) represents a non-specific band and has been previously reported [20]. A similar increase was observed in PGE<sub>2</sub> production by Hec-1-A cells following exposure to oxytocin (Fig. 2E). To confirm that oxytocin increases invasiveness of Hec-1-A cells via PGE<sub>2</sub> production, we performed an invasion assay by using SC-19220 (a selective antagonist of PGE<sub>2</sub>) which blocks the activity of EP1 receptor. We had previously demonstrated the presence of this receptor in the Hec-1-A endometrial carcinoma cell line [21]. We found that SC-19220 blocks OT- and PGE<sub>2</sub>-induced Hec-1-A cells invasion (Fig. 2F). These results indicate that oxytocin increases invasion of HEC cells through the upregulation of PTGS isoforms and subsequent PGE<sub>2</sub> production.

### ***Oxytocin Up-regulates PTGS Isoforms by Activating PI3-K***

We have previously reported that the PI 3-K/AKT survival pathway is involved in the regulation of PTGS2 and PGE<sub>2</sub> synthesis in human endometrial cancer cells [22;23]. Next we evaluated the effect of specific PI 3-K inhibitor LY294002, COX-1 inhibitor Indomethacin and PTGS2 activity inhibitor NS-398 on OT-induced invasion in Hec-1-A cells. Interestingly, we found that these three inhibitors prevented OT-induced invasion of Hec-1-A cells (Fig. 3A). LY294002 totally blocked the effect of OT in terms of PTGS1 and PTGS2 upregulation (Fig. 3B-C, D-E) suggesting that PI 3-K activation takes place upstream of PTGS1 and PTGS2 up-regulation in Hec-1-A cells. Moreover, we observed that under OT stimulation Indomethacin increased PTGS2 expression (Fig. 3D-E) whereas NS-398 increased PTGS1 expression (Fig. 3B-C) suggesting a counterbalance mechanism between these two cyclooxygenases. As previously reported, we observed that NS-398 did not alter PTGS2 protein expression [24;25]. These results indicate that OT confers invasive properties to Hec-1-A cells via activation of PI3-K/AKT pathway which leads to the upregulation of PTGS isoforms.

### ***XIAP is Involved in OT-induced Invasion in HEC cells via PI3-K and PTGS2***

We have recently reported that PI3-K activity was involved in the up-regulation of XIAP which play an important role in invasiveness of endometrial cancer cells in response to TGF $\beta$  [26]. XIAP is constitutively expressed in resting HEC cells however, treatment with OT leads to XIAP upregulation in these cells (Fig. 4A-D). As hypothesized, PI3-K inhibitor LY294002 blocked the OT-induced up-regulation of XIAP (Fig. 4E-F). Because activation of PI3-K by OT leads to up-regulation of PTGS1 and PTGS2 levels, we have examined the ability of these enzymes to regulate XIAP expression. We found that PTGS1 inhibitor Indomethacin did not prevent OT induced XIAP expression, however, PTGS2 activity inhibitor NS-398 effectively blocked OT-induced XIAP expression (Fig. 4G-H). Next we downregulated PTGS2 levels using PTGS2 shRNA, we observed more than 50% reduction in PTGS2 levels. Reduced PTGS2 levels also led to the downregulation of XIAP levels suggesting that COX-2 might regulate XIAP levels in Hec-1-A cells under OT stimulation (Fig. 4I-J). Further, we investigated if

XIAP is a key player involved in the OT induced invasiveness in Hec-1-A cells. To test this, Hec-1-A cells were transfected with XIAP siRNA. We observed an approximately 50% reduction in the endogenous XIAP protein levels (Fig. 5A-B). Reduced XIAP levels completely blocked the ability of OT to increase the invasiveness of Hec-1-A cells (Fig. 5C). Moreover, reducing XIAP level increased the apoptosis of Hec-1-A cells upon treatment with oxytocin (Fig. 5D) suggesting a protective role of XIAP during OT induced apoptosis. Taken together, these results imply that XIAP is regulated by PTGS2 via PI3-K/AKT activation and plays a crucial role in OT induced invasion and survival of HEC cells.

***OT-mediated Up-regulation of MMP14 and MMP2 are PTGS1- and PTGS2-dependent, respectively***

Because MMP14 and MMP2 have been identified as important participants in tumor cell invasion [27], we have examined whether OT induced invasiveness of Hec-1-A cells also occurs via these two matrix metalloproteinases. We found that resting Hec-1-A cells express detectable levels of both MMP14 and MMP2 but exposure to OT induced an up-regulation of their transcripts (Fig. 6A) and proteins (Fig. 6B). Treatment with Indomethacin did not impede the up-regulation of MMP2 expression in Hec-1-A cells by OT (Fig. 6C-D) but the treatments with NS-398 or LY294002 blocked OT-induced MMP2 upregulation, indicating a regulatory role of PTGS2 and PI3-K in OT induced MMP2 expression. In addition, we found that Indomethacin treatment decreased MMP14 expression in Hec-1-A cells (Fig. 6E-F). Pre-treatment with LY294002 for 1 h inhibits OT induced MMP14 expression whereas NS-398 could not inhibit OT induced MMP14 expression. Collectively, these results indicate that up-regulation of MMP14 and MMP2 following OT stimulation is a result of PI 3-K-dependent up-regulation of PTGS1 and PTGS2 in HEC cells.

***OTR Is Expressed in Endometrial Carcinoma Tumors In Vivo***

To correlate our findings for a role of OTR in the invasiveness of HEC cells with the clinical data, we have performed immunofluorescence analysis on an endometrial

carcinoma tissue panel representing various grades of the disease (Fig. 7). OTR expression was observed in epithelial and glandular cells from the grade I (Fig. 7A), and grade II (Fig. 7B) of endometrial carcinoma specimens and even in poorly-differentiated grade III (Fig. 7C). Moreover, few cells in the stroma compartment showed OTR signal in the grade I tumors. Additionally, we found that the immunostaining for OTR decreases with advanced grades. In the normal endometrium and in smooth muscles tissue samples, OTR immunoreactivity was undetectable (Fig. 7D-E). Altogether, these results indicate that OTR is expressed in all the grades of endometrial tumors samples *in vivo*.

### 3.3.5 Discussion

Recent findings have greatly expanded the classical roles of oxytocin which were mainly linked with reproductive functions [28-33]. Moreover, novel sites of oxytocin receptor expression have been identified in many peripheral organs [28;34-39] suggesting that OT has physiological functions. OTR has also been described in various carcinoma cells [15;40-45] where OT may regulate cell proliferation depending on cancer cell type. Cassoni *et al.* [15] have reported that OT significantly inhibited cell proliferation of endometrial carcinoma without inducing apoptosis. Beyond the growth-inhibiting aspect of OT, the purpose of this study was to investigate the possibility that OT may promote the invasiveness of resistant endometrial cancer cells by upregulating or stimulating selected factors of tumor aggressiveness such as PTGS2/PGE<sub>2</sub>, PI3-K/AKT and XIAP.

We have worked with Hec-1-A and Ishikawa cell lines commonly used as a model of endometrial carcinoma cells and are found to be OTR-positive, poorly invasive in basal conditions and resistant to many molecule such as TGFB and TNF [26;46]. We show for the first time that OT can induce invasion in endometrial cancer cells which are also resistant to the growth inhibitory effects of OT.

It is well accepted that production of prostaglandins by endometrial epithelial cells under basal conditions is regulated through the constitutive expression of PTGS1 whereas,

under stimulated conditions prostaglandin production is a results of the up-regulation of PTGS2 expression [47]. Our results support this concept because resting HEC cells express high levels of PTGS1 but very low level of PTGS2 and PGE<sub>2</sub> concentration. After OT stimulation, the expression of both the isoforms of cyclooxygenases and PGE<sub>2</sub> is up-regulated in HEC cells. Together, these results suggest that OT induced PGE<sub>2</sub> production occurs via the up-regulation of PTGS2 expression rather than PTGS1. Moreover, we showed that OT increased the invasiveness of endometrial carcinoma cells through production of PGE<sub>2</sub> and EP1 receptor.

Further, we reported the specific contribution of each cyclooxygenase isoform to the OT-induced invasion using specific pharmacological inhibitors. We found that both PTGS1 and PTGS2 are necessary for the OT-induced invasion of HEC cells which was inhibited by PI3-K inhibitor LY294002. Furthermore, OT was able to induce AKT phosphorylation/activation which was also inhibited by LY294002, thus suggesting that PI3-K/AKT pathway plays a central role in endometrial cancer cell invasion. The effect of OT to increase invasion, however, is not same for all tissue types. Previously, OT was found to inhibit proliferation, migration and invasion of ovarian cancer cells [45]. The reason for this difference as compared to endometrial cancer cells could be tissue specificity and dose dependence as the authors have used lower concentration of OT as compared to the concentration used in the present study.

Previously, the involvement of PTGS2/PGE<sub>2</sub>/MMP pathway in increasing cell migration and invasion has been reported [48]. Here, we demonstrated that both PTGS1 and PTGS2 are required for the increase in MMP2 and MMP14 activities. Indeed, the action of the two cyclooxygenases seems to act synergistically: PTGS1 triggers MMP14 which has been shown to be one of the major activators of MMP2 in invasive tumors [49] while PTGS2 up-regulates MMP2 expression. To our knowledge, this is the first report of such collaborative regulation of MMP2 and MMP14 by COX isoforms. A recent study [50] showed that PTGS1 and PTGS2 play essential roles in gonadotropin-induced migration and invasion in human ovarian cancer cells supporting our findings that the

expression of the two isoforms of cyclooxygenases were critical for OT-induced invasive properties in endometrial carcinoma cells.

We had recently reported the involvement of XIAP in the regulation of invasion of endometrial carcinoma cells that had been exposed to TGFB [26] given the indication that XIAP could be a critical factor in the invasiveness of endometrial carcinoma cells. We have investigated a putative role of XIAP in the OT-induced invasion of HEC cells. OT increased XIAP protein level in Hec-1-A and Ishikawa cells in a PTGS2-dependent manner which is in concordance with activation of the NF- $\kappa$ B pathway as shown in other cell types [22;51]. In addition, we also found that XIAP is required to induce invasion in HEC cells that had been exposed to OT. XIAP is a ubiquitous protein known to protect cells against apoptosis by binding and inhibiting caspase pathway [52]. Although no toxic effects or apoptosis were reported with OT [15], it is therefore not surprising that inhibition of XIAP, by RNA interference, increased the number of apoptotic cells. However, we cannot rule out the possibility that the reduction in invasion followed by XIAP knockdown could be due to increased apoptotic count. Taken together, these results highlight the importance of XIAP in invasion as well as in resistance to apoptosis in endometrial carcinoma cells.

Finally, we have correlated the presence of OTR in endometrial carcinoma tumors with the grade of the disease *in vivo*. In the normal cycling endometrium, OTR is shown to be under sex steroids regulation and high levels of OTR are present in the luteal phase [53]. It is therefore not surprising that OTR signal detected by immunofluorescence analysis and confirmed by IHC was low/undetectable in normal endometrium tissue samples. By contrast, OTR immunoreactivity was strongly expressed in tumor tissue. Upon tumor progression from grade I to grade III, the OTR is localized mostly in the epithelial and glandular compartment which is consistent with a role for OTR in the invasiveness of HEC cells. These results indicate that overexpression of the OTR is an important factor to induce cancer progression, and further, metastasis in the presence of OT in the system.

### **3.3.6 Conclusion**

In summary, we provide the first evidence that OT could efficiently increase invasion in HEC cells through different factors such as PTGS1, PTGS2 and XIAP which all seem to be dependent on the activation of PI3-K. Moreover, we have identified a key role for XIAP in OT-induced invasion which is PTGS2-dependent. The present study further suggests that the presence of oxytocin receptor in endometrial cancer cells may therefore be considered as a major factor involved in the progression of endometrial cancer.



### 3.3.7 Reference List

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300.
- [2] Holland James F, Frei Emil III. *Cancer Medicine*. Kufe Donald W, Bast Robert C, Hait William N, Ki Hong Waun, Pollock Raphael E, and Weichselbaum Ralph R. 7th edition, 1522-1538. 2006. BC Decker Inc.
- [3] Silverman AJ, Zimmerman EA. Magnocellular neurosecretory system. *Annu Rev Neurosci* 1983; 6: 357-380.
- [4] Cassoni P, Marrocco T, Deaglio S, Sapino A, Bussolati G. Biological relevance of oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and primary tumors. *Ann Oncol* 2001; 12 Suppl 2:S37-9.: S37-S39.
- [5] Cassoni P, Sapino A, Marrocco T, Chini B, Bussolati G. Oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and proliferation. *J Neuroendocrinol* 2004; 16: 362-364.
- [6] Kimura T, Tanizawa O, Mori K, Brownstein MJ, Okayama H. Structure and expression of a human oxytocin receptor. *Nature* 1992; 356: 526-529.
- [7] Zingg HH, Laporte SA. The oxytocin receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14: 222-227.
- [8] Bussolati G, Cassoni P. Editorial: the oxytocin/oxytocin receptor system-expect the unexpected. *Endocrinology* 2001; 142: 1377-1379.
- [9] Asselin E, Goff AK, Bergeron H, Fortier MA. Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F2 alpha and E2 and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod* 1996; 54: 371-379.
- [10] Tithof PK, Roberts MP, Guan W, Elgayyar M, Godkin JD. Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2alpha production by bovine endometrial epithelial cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; 5: 16.
- [11] Copland JA, Jeng YJ, Strakova Z, Ives KL, Hellmich MR, Soloff MS. Demonstration of functional oxytocin receptors in human breast Hs578T cells and their up-regulation through a protein kinase C-dependent pathway. *Endocrinology* 1999; 140: 2258-2267.

- [12] Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis* 2009; 30: 377-386.
- [13] Kennedy TG. Prostaglandins and uterine sensitization for the decidual cell reaction. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 476: 43-48.
- [14] Wu WK, Yiu Sung JJ, Lee CW, Yu J, Cho CH. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms. *Cancer Lett* 2010; 295: 7-16.
- [15] Cassoni P, Fulcheri E, Carcangiu ML, Stella A, Deaglio S, Bussolati G. Oxytocin receptors in human adenocarcinomas of the endometrium: presence and biological significance. *J Pathol* 2000; 190: 470-477.
- [16] Cassoni P, Marrocco T, Bussolati B, Allia E, Munaron L, Sapino A, Bussolati G. Oxytocin induces proliferation and migration in immortalized human dermal microvascular endothelial cells and human breast tumor-derived endothelial cells. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 351-359.
- [17] Cattaneo MG, Chini B, Vicentini LM. Oxytocin stimulates migration and invasion in human endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2008; 153: 728-736.
- [18] Narko K, Ristimaki A, MacPhee M, Smith E, Haudenschild CC, Hla T. Tumorigenic transformation of immortalized ECV endothelial cells by cyclooxygenase-1 overexpression. *J Biol Chem* 1997; 272: 21455-21460.
- [19] Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M. Multiple roles of cyclooxygenase-2 in endometrial cancer. *Anticancer Res* 2005; 25: 3679-3687.
- [20] Moore AE, Greenhough A, Roberts HR, Hicks DJ, Patsos HA, Williams AC, Paraskeva C. HGF/Met signalling promotes PGE(2) biogenesis via regulation of COX-2 and 15-PGDH expression in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1796-1804.
- [21] Sexton E, Van Themsche C, Leblanc K, Parent S, Lemoine P, Asselin E. Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. *Mol Cancer* 2006; 5: 45.
- [22] St Germain ME, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer* 2004; 3:7.: 7.

- [23] St Germain ME, Gagnon V, Mathieu I, Parent S, Asselin E. Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int J Oncol* 2004; 24: 1311-1324.
- [24] Amir M, Agarwal HK. Role of COX-2 selective inhibitors for prevention and treatment of cancer. *Pharmazie* 2005; 60: 563-570.
- [25] Gao J, Mazella J, Tang M, Tseng L. Ligand-activated progesterone receptor isoform hPR-A is a stronger transactivator than hPR-B for the expression of IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein-1) in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 1954-1961.
- [26] Van Themsche C, Mathieu I, Parent S, Asselin E. Transforming growth factor-beta3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis and protein kinase c-dependent induction of matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 2007; 282: 4794-4802.
- [27] Zhang Z, Song T, Jin Y, Pan J, Zhang L, Wang L, Li P. Epidermal growth factor receptor regulates MT1-MMP and MMP-2 synthesis in SiHa cells via both PI3-K/AKT and MAPK/ERK pathways. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 998-1003.
- [28] Blanks AM, Thornton S. The role of oxytocin in parturition. *BJOG* 2003; 110 Suppl 20: 46-51.
- [29] Chandrasekher YA, Fortune JE. Effects of oxytocin on steroidogenesis by bovine theca and granulosa cells. *Endocrinology* 1990; 127: 926-933.
- [30] Einspanier A, Ivell R, Hodges JK. Oxytocin: a follicular luteinisation factor in the marmoset monkey. *Adv Exp Med Biol* 1995; 395: 517-522.
- [31] Einspanier A, Jurdzinski A, Hodges JK. A local oxytocin system is part of the luteinization process in the preovulatory follicle of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biol Reprod* 1997; 57: 16-26.
- [32] Flint AP, Lamming GE, Stewart HJ, Abayasekara DR. The role of the endometrial oxytocin receptor in determining the length of the sterile oestrous cycle and ensuring maintenance of luteal function in early pregnancy in ruminants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994; 344: 291-304.
- [33] Kiss A, Mikkelsen JD. Oxytocin--anatomy and functional assignments: a minireview. *Endocr Regul* 2005; 39: 97-105.

- [34] Frayne J, Nicholson HD. Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 527-532.
- [35] Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 2001; 81: 629-683.
- [36] Ivell R, Balvers M, Rust W, Bathgate R, Einspanier A. Oxytocin and male reproductive function. *Adv Exp Med Biol* 1997; 424: 253-264.
- [37] Jankowski M, Hajjar F, Kawas SA, Mukaddam-Daher S, Hoffman G, McCann SM, Gutkowska J. Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14558-14563.
- [38] Lefebvre DL, Giaid A, Bennett H, Lariviere R, Zingg HH. Oxytocin gene expression in rat uterus. *Science* 1992; 256: 1553-1555.
- [39] Lefebvre DL, Giaid A, Zingg HH. Expression of the oxytocin gene in rat placenta. *Endocrinology* 1992; 130: 1185-1192.
- [40] Cassoni P, Sapino A, Negro F, Bussolati G. Oxytocin inhibits proliferation of human breast cancer cell lines. *Virchows Arch* 1994; 425: 467-472.
- [41] Cassoni P, Sapino A, Fortunati N, Munaron L, Chini B, Bussolati G. Oxytocin inhibits the proliferation of MDA-MB231 human breast-cancer cells via cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A. *Int J Cancer* 1997; 72: 340-344.
- [42] Cassoni P, Sapino A, Stella A, Bussolati G. Antiproliferative effect of oxytocin through specific oxytocin receptors in human neuroblastoma and astrocytoma cell lines. *Adv Exp Med Biol* 1998; 449: 245-246.
- [43] Cassoni P, Sapino A, Stella A, Fortunati N, Bussolati G. Presence and significance of oxytocin receptors in human neuroblastomas and glial tumors. *Int J Cancer* 1998; 77: 695-700.
- [44] Cassoni P, Sapino A, Munaron L, Deaglio S, Chini B, Graziani A, Ahmed A, Bussolati G. Activation of functional oxytocin receptors stimulates cell proliferation in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines. *Endocrinology* 2001; 142: 1130-1136.
- [45] Morita T, Shibata K, Kikkawa F, Kajiyama H, Ino K, Mizutani S. Oxytocin inhibits the progression of human ovarian carcinoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2004; 109: 525-532.

- [46] Van Themsche C, Lafontaine L, Asselin E. X-linked inhibitor of apoptosis protein levels and protein kinase C activity regulate the sensitivity of human endometrial carcinoma cells to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Endocrinology* 2008; 149: 3789-3798.
- [47] Parent J, Villeneuve C, Fortier MA. Evaluation of the contribution of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 to the production of PGE2 and PGF2 alpha in epithelial cells from bovine endometrium. *Reproduction* 2003; 126: 539-547.
- [48] Lee EJ, Choi EM, Kim SR, Park JH, Kim H, Ha KS, Kim YM, Kim SS, Choe M, Kim JI, Han JA. Cyclooxygenase-2 promotes cell proliferation, migration and invasion in U2OS human osteosarcoma cells. *Exp Mol Med* 2007; 39: 469-476.
- [49] Mignon C, Okada A, Mattei MG, Basset P. Assignment of the human membrane-type matrix metalloproteinase (MMP14) gene to 14q11-q12 by in situ hybridization. *Genomics* 1995; 28: 360-361.
- [50] Lau MT, Wong AS, Leung PC. Gonadotropins induce tumor cell migration and invasion by increasing cyclooxygenases expression and prostaglandin E(2) production in human ovarian cancer cells. *Endocrinology* 2010; 151: 2985-2993.
- [51] Xiao CW, Ash K, Tsang BK. Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Endocrinology* 2001; 142: 557-563.
- [52] Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; 388: 300-304.
- [53] Fuchs AR, Fuchs F, Soloff MS. Oxytocin receptors in nonpregnant human uterus. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60: 37-41.

### 3.3.8 Figure legends

**Figure 1:** OT increases invasive properties of HEC cells. OTR expression (A) was detected by Western blot in Hec-1-A and Ishikawa cells. HeLa cells were used as a positive control and ACTB was used as loading control. Representative result is shown. Hec-1-A cellular proliferation (B) after treatment with different doses of OT for 24 h, 48 h and 72 h was assessed using MTT proliferation assay. The results are the means  $\pm$  S.E. of four independent experiments, each performed in duplicate. Statistical significance was not achieved. (C) The effect of OT (1  $\mu$ M) on the invasive properties of Hec-1-A cells was determined by using Matrigel invasion assay for the indicated times. The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments performed in duplicate. \* indicates a *p* value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 24 h of treatment. ° indicates a *p* value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 48 h of treatment and ▪ indicates a *p* value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 72 h of treatment.

**Figure 2:** OT-induced up-regulation of PTGS isoforms and PGE<sub>2</sub> production increases the invasiveness of HEC cells. (A) PTGS1 and PTGS2 (arrow indicates upper band) expression were analysed by Western Blots in Hec-1-A cells after 24h of treatment with indicated concentrations of OT. ACTB was used as a loading control; representative results are shown. (B) Densitometric analysis of results obtained in (A). The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a *p* value of  $< 0.05$  when compared with untreated (control) cells for PTGS1. ■ indicates a *p* value of  $< 0.05$  when compared with untreated (control) cells for PTGS2. (C) PTGS2 expression was analysed by western blot analysis in Ishikawa cells after 24h of treatment with 1 $\mu$ M of OT. (D) Densitometric analysis of results obtained in (C). The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a *p* value of  $< 0.05$  when compared with untreated (control) cells. (E) The effect of OT on PGE<sub>2</sub> production by Hec-1-A cells was determined using EIA assay following 24, 48 or 72h of treatment with 1 or 10  $\mu$ M of OT. Data represent the mean  $\pm$  of three independent experiments. \* indicates a *p* value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 24 h of treatment. ° indicates a *p* value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 48 h of treatment and

▪ indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 72 h of treatment. (F) Involvement of the PGE<sub>2</sub> and EP1 receptor in the invasion induced by OT in Hec-1-A cell line were determined by Matrigel invasion assay without pretreatment or following 1h of pretreatment with 10 $\mu$ M of SC-19220 before adding 100nM of PGE<sub>2</sub> for 24h or 1 $\mu$ M of oxytocin in the lower chamber when the assays were performed. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control), ° indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to OT-treated cells and ▪ when compared to PGE<sub>2</sub>-treated cells.

**Figure 3:** OT-induced invasiveness occurs via the activation of PI3-K in HEC cells. The involvement of PTGS1, PTGS2 and PI3-K on the invasive properties of Hec-1-A cells upon exposure to OT (1 $\mu$ M) was determined using (A) Matrigel invasion assay was performed following 1h of pretreatment with 20  $\mu$ M LY294002, 100 nM Indomethacin or 10  $\mu$ M NS-398 and 24h OT treatment; the results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control), ° indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to OT-treated cells (B) Western blot analysis was also performed for PTGS1; the cells were pretreated for 1h with or without 20  $\mu$ M LY294002, 100 nM Indomethacin or 10  $\mu$ M NS-398 before adding 1  $\mu$ M of OT for 24 h.  $\beta$ -actin was used as a loading control; a representative result is shown. (C) Densitometric analysis of results presented in B. The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control), ° indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to OT-treated cells. (D) Western blot analysis for PTGS2 (arrow indicates upper band); the cells were pretreated for 1 h with or without 20  $\mu$ M LY294002, 100 nM Indomethacin or 10  $\mu$ M NS-398 before adding 1  $\mu$ M of OT for 24 h. ACTB was used as a loading control; a representative result is shown. (E) Densitometric analysis of results presented in D. The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control), ° indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to OT-treated cells.

**Figure 4:** OT up-regulates XIAP via PI3-K and PTGS-2 in HEC cells. (A) XIAP expression was measured by Western blot analysis in Hec-1-A cells after exposure of 1  $\mu$ M of OT for the indicated times. ACTB was used as a loading control; a representative result is shown. (B) Densitometric analysis of results presented in A. The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 24 h of treatment, ° indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 48 h of treatment and ▪ indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 72 h of treatment. (C) XIAP expression was measured by Western blot analysis in Ishikawa cells after exposure of 1  $\mu$ M of OT for 24 h. ACTB was used as a loading control. (D) Densitometric analysis of results presented in C. The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 24 h of treatment, (E) To determine the involvement of PI3-K in XIAP up-regulation by OT, western blot analysis was performed following a pretreatment for 1 h in Hec-1-A cells with 20  $\mu$ M of LY294002, a PI3-K specific inhibitor before adding 1  $\mu$ M of OT for the indicated times. ACTB was used as a loading control; a representative result is shown. (F) Densitometric analysis of results presented in E. The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 24 h of treatment, ° indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 48 h of treatment and ▪ indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control) after 72 h of treatment. (G) The ability of PTGS isoforms to up-regulate XIAP was determined by using Western blot analysis. The cells were pretreated with 100 nM of Indomethacin or 10  $\mu$ M of NS-398 for 1 h before treatment with 1  $\mu$ M of OT for 24 h.  $\beta$ -actin was used as a loading control; a representative result is shown. (H) Densitometric analysis of results presented in G. The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control), ° indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to OT-treated cells. (I) PTGS2 levels were downregulated using shRNA against PTGS2. Protein levels of PTGS2, XIAP and ACTB were determined by western blot analysis. (J). Densitometric analysis of results presented in I. The results are the means  $\pm$  S.E. of three



independent experiments. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untransfected cells (control)

**Figure 5:** XIAP is involved in the invasiveness of HEC cells by OT. (A) Western blot analysis was performed to determine XIAP content following XIAP siRNA targeting in presence or absence of 1  $\mu$ M of OT. ACTB was used as a loading control; a representative result is shown. (B) Densitometric analysis of results presented in A. The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control), ° indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to OT-treated cells. (C) The effect of reduction of XIAP on Hec-1-A invasion was determined by Matrigel invasion assay after treatment with 1 $\mu$ M of OT added in the lower chamber of the assay for 24 h. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control), ° indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to OT-treated cells. (D) Apoptotic index following a XIAP reduction in the presence and absence of 1  $\mu$ M of OT was determined using Hoechst nuclear staining. The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$ .

**Figure 6:** Involvement of PTGS1 and PTGS2 in the OT-mediated up-regulation of MMP14 and MMP2. (A) The mRNA levels of MMP2, MMP14 and TIMP2 were determined in Hec-1-A cells by RT-PCR following treatment with 1 $\mu$ M of OT for 24 h.  $\beta$ -actin was used as a loading control; a representative result is shown. (B) Gelatin zymography was performed to analyse MMP2 activity upon treatment with 1  $\mu$ M of OT for 24 h whereas MMP14 activity was determined by western blot analysis. ACTB was used as a loading control; a representative result is shown. (C) The involvement of PTGS1, PTGS2 and PI3-K on MMP2 was determined by RT-PCR after a pretreatment of 1 h with 20  $\mu$ M LY294002 or 100 nM of Indomethacin or 10  $\mu$ M of NS-398 followed by 24h incubation with 1  $\mu$ M of OT. ACTB was used as a loading control; a representative result is shown. (D) Densitometric analysis of results presented in C. The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to untreated cells (control), ° indicates a  $p$  value of  $< 0.05$  when compared to OT-treated cells. (E) The involvement of PTGS1, PTGS2 and PI3-K in the

regulation of MMP14 was determined by RT-PCR after a pretreatment of 1 h with 20  $\mu$ M LY294002 or 100 nM of Indomethacin or 10  $\mu$ M of NS-398 followed by 24h incubation with 1 $\mu$ M of OT. ACTB was used as a loading control; a representative result is shown. (F) Densitometric analysis of results presented in C. The results are the means  $\pm$  S.E. of three independent experiments. \* indicates a *p* value of < 0.05 when compared to untreated cells (control), ° indicates a *p* value of < 0.05 when compared to OT-treated cells.

**Figure 7:** OTR is expressed in endometrial carcinoma tumors *in vivo*. OTR immunoreactivity (green) in human endometrial carcinoma grade I (A), grade II (B) and grade III (C), smooth muscles (D) and normal endometrial tissue (E) was assessed using Cybrdi human endometrial tissue array slides. For negative control, primary antibody was substituted with rabbit IgG (F). Hoechst dye was used to visualize nuclei (blue). Results shown are representative of 16 grade I, 34 grade II, 5 grade III tumors, 2 smooth muscles and 3 normal endometrial specimens. Original magnification x 200.

### 3.3.9 Tables

Table 1: Primers for PCR amplification

Gene	Forward Primer	Reverse Primer	T <sub>m</sub>	Product size (bp)
<i>MMP2</i>	AGGCAAGTGGTCCGTGTGAA	ACAGTGGACATGGCGGTGTCAG	66	369
<i>MMP14</i>	CCAGGGTCTCAAATGGCAACA	CCATGGAAGCCCTCGGCAAA	66	219
<i>TIMP2</i>	ATGCAGATGTAGTGATCAGGGC	CATCACCTCTGTGACTTCATC	58	272
<i>ACTB</i>	GAGGATCTTCATGAGGTAGTCTGT CAGGTC	CAACTGGGACGACATGGAGAAGAT CTGGCA	58	348

3.3.10 Figures

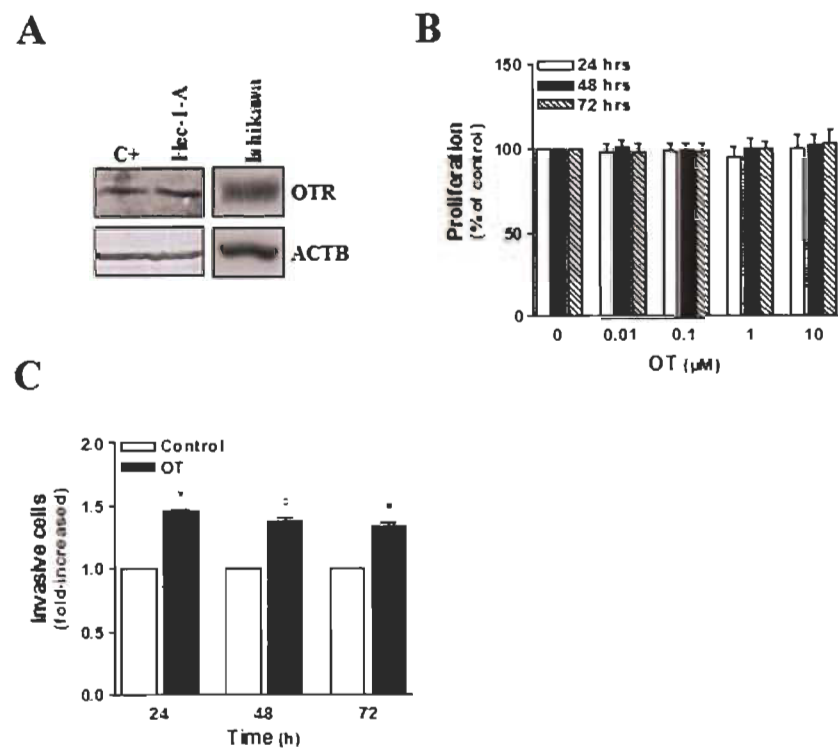


Figure 1: Dery et al.

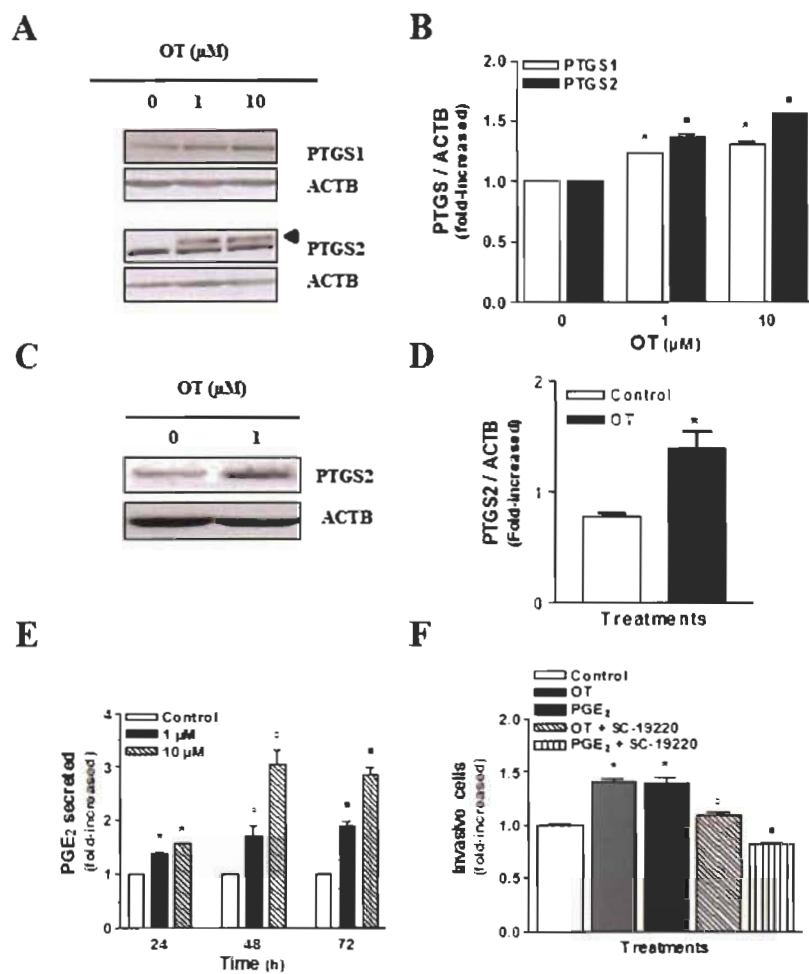


Figure 2: Dery et al.

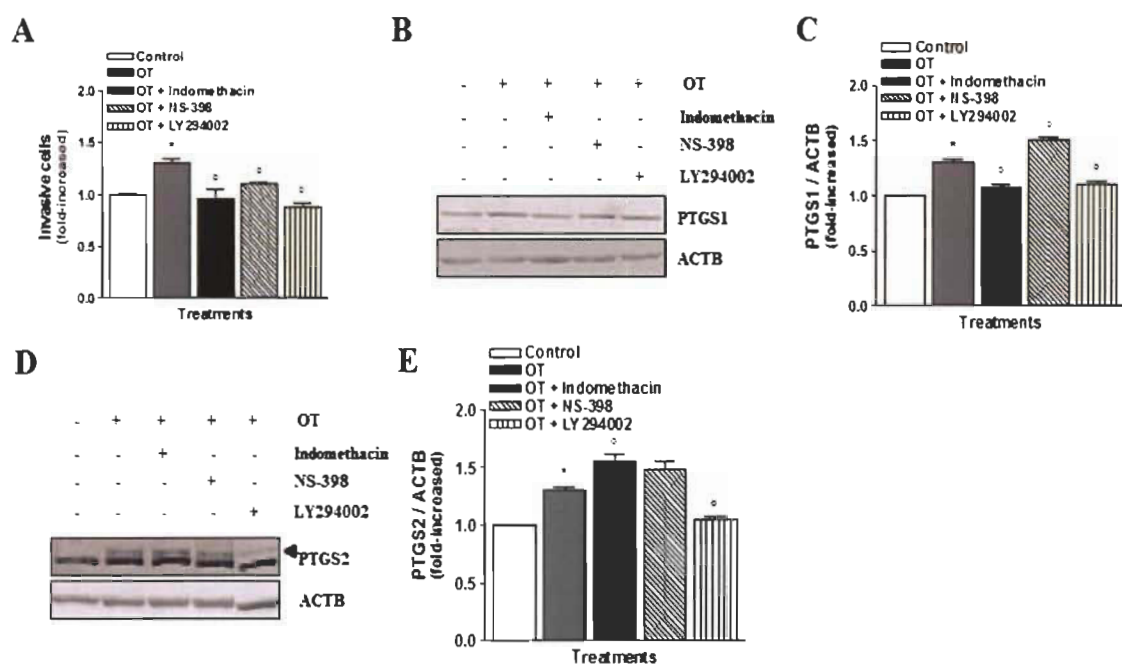


Figure 3: Dery et al.

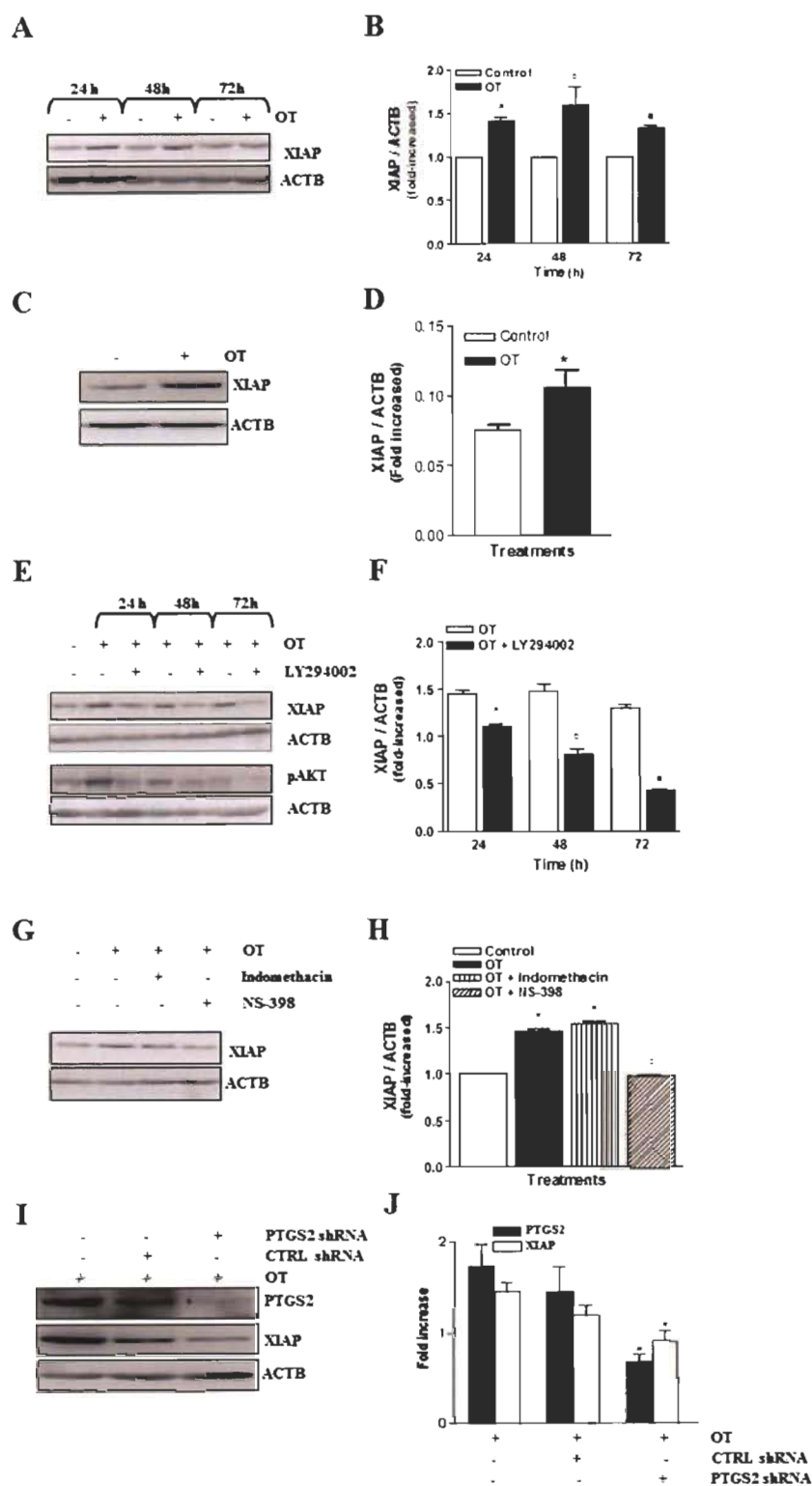


Figure 4: Dery et al.

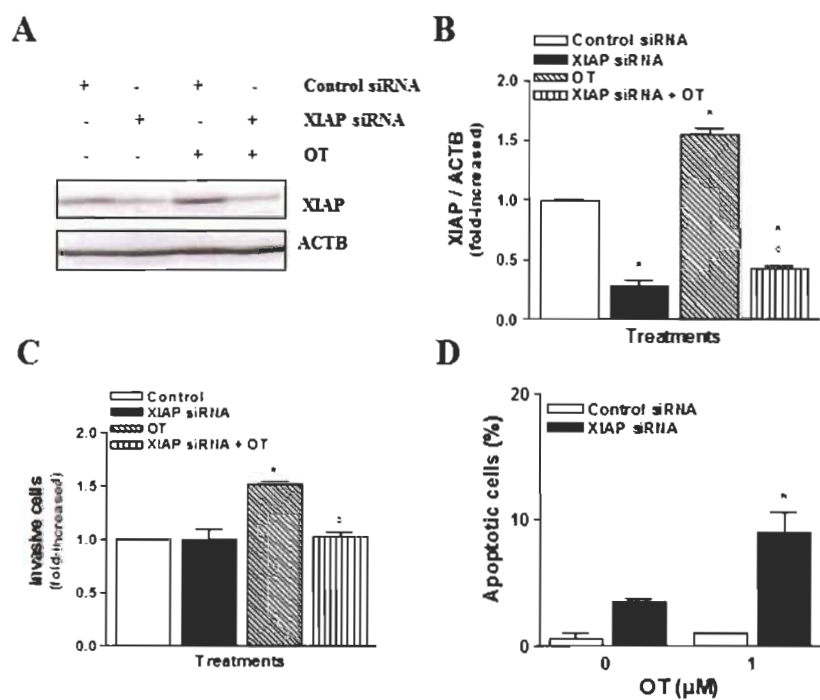


Figure 5: Dery et al.

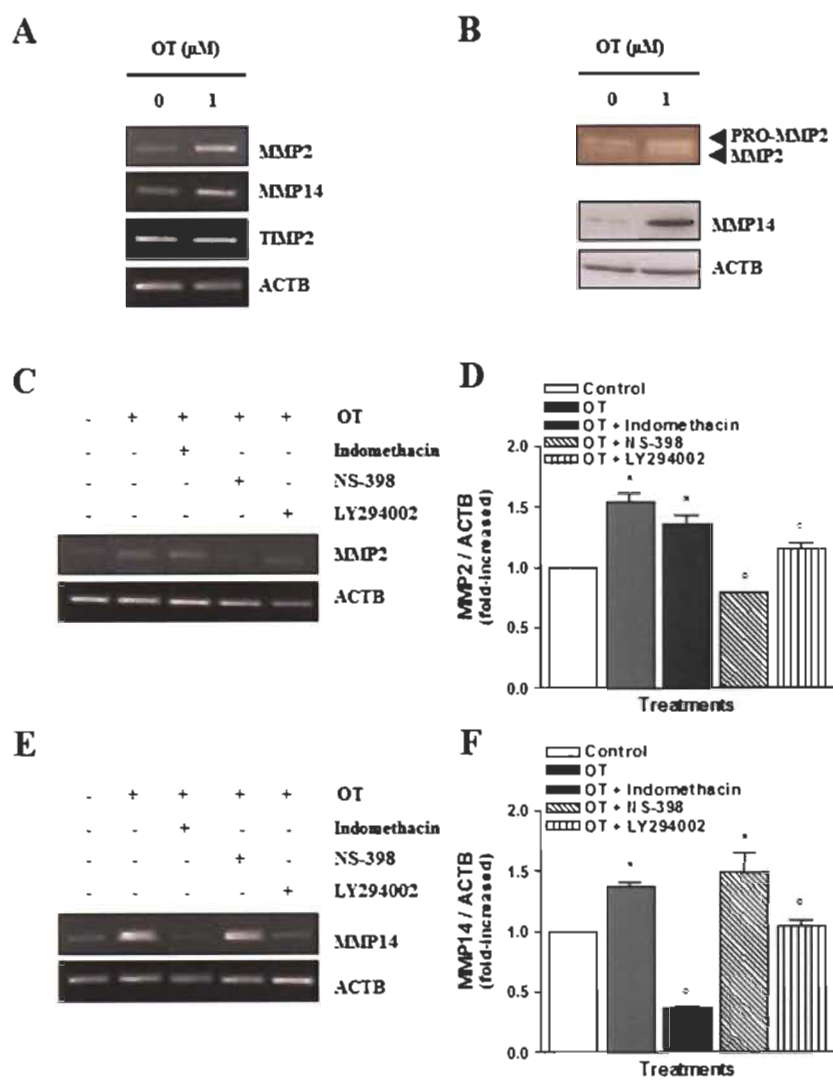
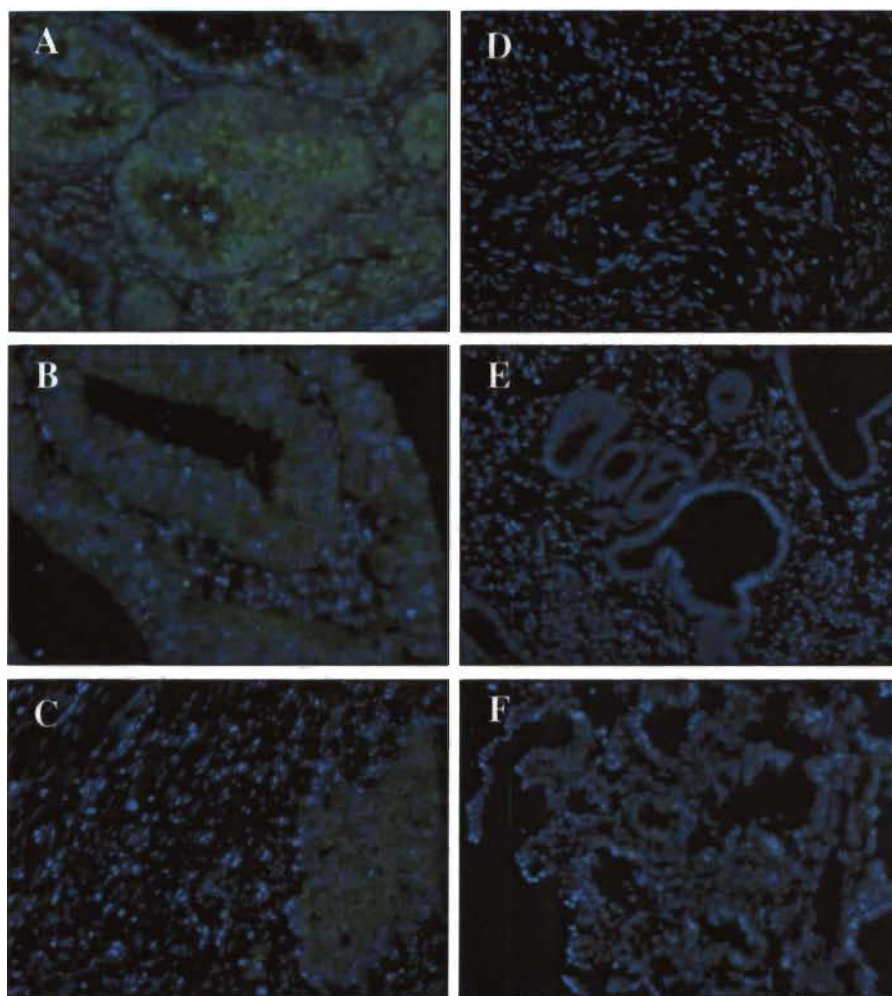


Figure 6: Dery et al.





**Figure 7: Dery et al.**

## CHAPITRE IV

### L'IMPLICATION DES VOIES PI 3-K/AKT, ERK1/2 ET PKC DANS L'INVASION TUMORALE INDUITE EN RÉPONSE À L'OCYTOCINE - RÉSULTATS NON PUBLIÉS -

#### 4.1 Introduction

Ce chapitre contient des résultats qui ont été générés lors du travail sur l'ocytocine mais qui n'ont pas été publiés dans l'article retrouvé au chapitre III.

Nous avons démontré pour la première fois que l'ocytocine pouvant induire l'invasion des cellules du carcinome endométrial. Les voies d'activation de l'ocytocine ne sont pas encore clairement établies encore à ce jour. Dans cette section, nous avons documenté l'implication de la voie de PI 3-K/Akt dans la réponse à l'ocytocine, de même que démontrer que les voies de ERK1/2 et PKC sont impliquées dans le processus d'invasion observé.

#### 4.2 Matériel et Méthodes

##### 4.2.1 Immunobuvardage de type Western Blot

Les cellules traitées sont lysées dans un tampon RIPA froid (PBS 1X pH 4; 1 % Nonidet P-40; 0,5 % Sodium deoxycholate; 0,1 % SDS) contenant des inhibiteurs de protéases (Complete, Roche, Laval, Quebec, Canada), soumises à trois cycles gel-dégel suivi d'une centrifugation (16,100 g, 20 min à 4°C) afin de retirer le matériel insoluble. Les protéines cellulaires sont ensuite dosées (Bio-Rad DC Protein Assay (Bio Rad, Mississauga, ON, CA)) puis chauffées afin de les dénaturer (95°C, 3 min). Les protéines (35 – 50 µg) sont séparées sur des gels 8-15 % SDS-PAGE et transférées sur des membranes de nitrocellulose (15 V, 30 min) avec un appareil de transfert semi-sec de Bio-Rad. Les sites non spécifiques de la membrane sont bloqués par du PBS-T (PBS 1X,

Tween 20 0,06 %) contenant 5 % de lait écrémé, pendant 1 heure à la température ambiante. La membrane est incubée toute la nuit avec le premier anticorps à 4°C sous agitation (1/1000 pour OTR). La membrane est lavée 3 fois avec du PBS-T puis mise en contact avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase "horseradish" anti-lapin ou anti-souris pour 45 minutes à température ambiante. La détection est effectuée avec le substrat SuperSignal West Femto (Pierce, Arlington Heights, IL) selon les indications fournies par le manufacturier.

#### **4.2.2 Test de prolifération au MTT**

Les cellules sontensemencées dans une plaque de 96 puits à une densité de  $1 \times 10^4$  cellules par puit afin d'obtenir une confluence de 80 % du tapis cellulaire après une nuit d'incubation à 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>/air. Les cellules sont ensuite cultivées pendant 24, 48 et 72 heures avec un milieu de culture additionné ou non des différentes concentrations d'ocytocine (0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 µM) à 37°C. Le sel de tétrazolium MTT (10 µL de 5 mg/mL de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényle tétrazolium (Sigma) dans du tampon phosphate (PBS)) est ajouté à chacun des puits 3,5 heures avant la fin de la période d'incubation. Les cellules vivantes actives convertissent alors le sel de tétrazolium (jaune) en précipité bleu, le formazan (blue thiazol). À la fin de la période d'incubation, la conversion du sel de tétrazolium est stoppée par l'ajout de 100 µL de solution de solubilisation (10 % dodécylsulfate de sodium (SDS), 0,1 % HCL) dans chaque puit. La microplate est incubée toute la nuit, à 37°C, afin de permettre la complète dissolution du formazan. La lecture des absorbances est ensuite effectuée avec le FluoStar Optima Reader (BMG Laboratories, Durham, NC) à 600 nm. Le pourcentage de cellules prolifératives a été établi par le rapport des absorbances des cellules traitées versus celles des cellules non-traitées. Les expériences ont été effectuées 3 fois, en duplicata.

### 4.2.3 Test d'invasion avec Matrigel

Les propriétés invasives des cellules Hec-1-A traitées avec de l'ocytocine ont été déterminées à l'aide de chambres d'invasion perméable avec une membrane de polycarbonate avec des pores de 8  $\mu\text{m}$  (Transwell® Permeable support, Costar 3432, Corning, USA) recouverte de 2 mg/mL de BD Matrigel Low<sup>TM</sup> dilué 1 :5 dans du milieu de culture frais sans sérum. Les cellules ont été pré-traitées pendant une heure en présence ou l'absence d'inhibiteurs (20  $\mu\text{M}$  de LY294002, 10  $\mu\text{M}$  PD98059, 10  $\mu\text{M}$  SB203580, 10  $\mu\text{M}$  KT5720 ou 2  $\mu\text{M}$  de chelerythrine chloride) suivi d'un traitement de 24 heures à 1  $\mu\text{M}$  d'OT. Puis les cellules ont été récoltées, lavées puis resuspendues dans leur milieu de culture sans sérum. Les chambres inférieures sont remplies de 600  $\mu\text{L}$  du milieu de culture frais contenant 5 % de sérum bovin avec ou sans 1  $\mu\text{M}$  d'OT tandis que  $1 \times 10^5$  cellules ont été ajoutées dans la chambre supérieure. Les plaques ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C. Après la période d'incubation, les cellules invasives ont atteints et adhérentes à la membrane poreuse tandis que les cellules non-invasives à la surface du filtre ont été retirées. Les cellules invasives ont été fixées avec du méthanol et le marquage nucléaire a été exécuté avec du Hoescht 33258 suivi d'une analyse densitométrique. Les essais sont exécutés en duplicata.

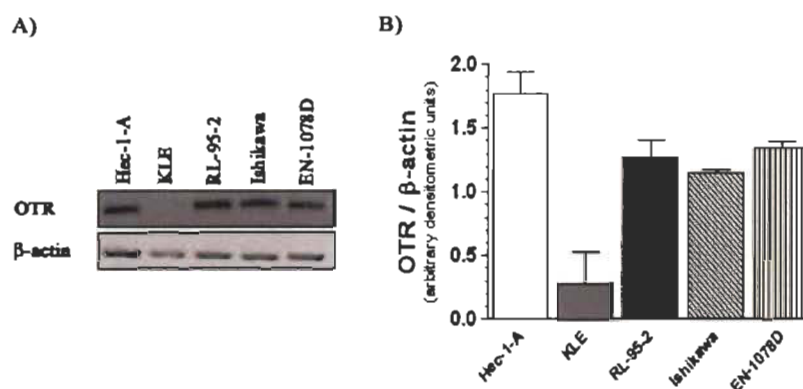
### 4.2.4 Marquage nucléaire au Hoescht

Les cellules traitées sont récoltées, lavées et resuspendues dans 1  $\mu\text{g/mL}$  de Hoescht 332258 (Sigma) dans 10 % de formaline puis incubées pour 24 heures à 4°C avant le comptage aveugle des cellules sous microscope à fluorescence (Olympus BX60). Pour chaque échantillon, un décompte de 300 cellules a été exécuté et le pourcentage des cellules apoptotiques calculé comme le ratio du nombre de cellules apoptotiques sur le nombre total de cellules comptées.

### 4.3 Résultats

#### 4.3.1 Présence du récepteur à l'ocytocine dans différentes lignées du cancer endométrial

Lors de notre étude sur l'ocytocine, nous avons déterminé la présence du récepteur à l'ocytocine (OTR) dans quelques lignées cellulaires du cancer endométrial (Figure 4.1). Hec-1-A, KLE et EN-1078D sont des lignées cellulaires dérivées d'adénocarcinomes endométriaux pauvrement différenciés tandis que les lignées RL-95-2 et Ishikawa proviennent respectivement d'adénocarcinomes modérément et bien différenciés. À l'aide de l'analyse de type Western blot, nous avons établi que seule la lignée KLE n'exprime pas OTR suggérant que le récepteur est largement distribué dans les carcinomes endométriaux et ce, à différents degrés de différenciation cellulaire.



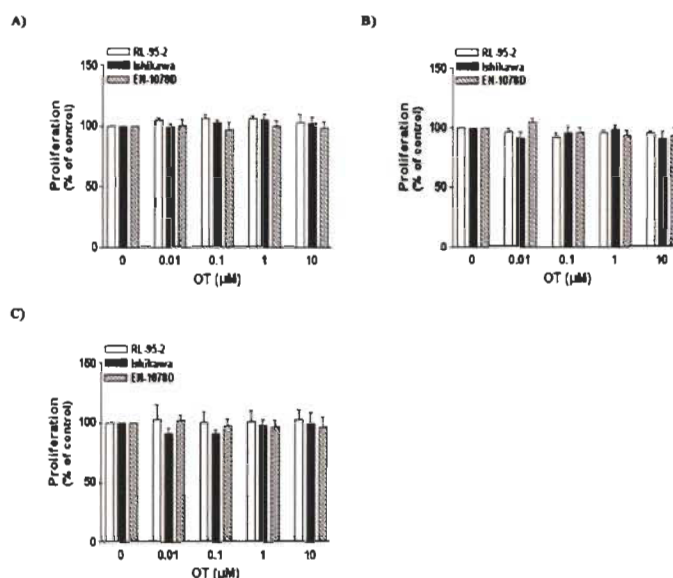
**Figure 4.1 : Présence du récepteur OTR dans différentes lignées du cancer endométrial humain.**

A) L'expression du récepteur a été détectée par analyse de type Western Blots. La  $\beta$ -actine est utilisée comme contrôle de normalisation de la quantité de protéines déposée sur le gel. B) L'analyse densitométrique des résultats obtenus en A. Les résultats graphiques représentent la moyenne  $\pm$  E.T. de trois expériences indépendantes.

### 4.3.2 L'effet de l'ocytocine sur la prolifération cellulaire dans différentes lignées du cancer endométrial

Il a été rapporté que l'ocytocine pouvait avoir un effet inhibiteur sur la croissance des cellules du carcinome endométrial via son récepteur OTR (Cassoni et al., 2000). Nous avons donc examiné l'effet de l'ocytocine sur la prolifération de nos différentes lignées du cancer endométrial exprimant le récepteur OTR en utilisant le test de prolifération au MTT (Figure 4.2).

Nous avons observé que les cellules des lignées RL-95-2, Ishikawa et EN-1078D sont résistantes, tout comme les Hec-1-A (publié), à l'effet inhibiteur de l'ocytocine sur la croissance cellulaire et ce même après une exposition de 72 heures à une concentration de 10  $\mu$ M d'OT.



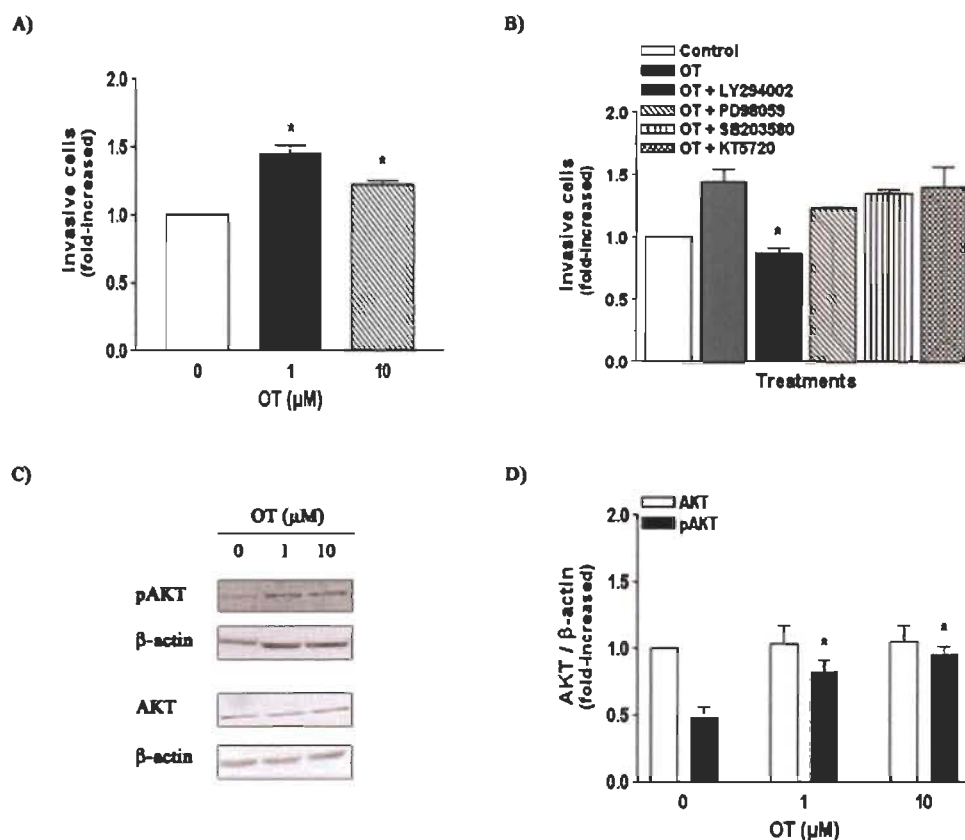
**Figure 4.2 : L'ocytocine n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules du cancer endométrial.**

L'effet régulateur de l'ocytocine sur la prolifération cellulaire a été évalué par le test de prolifération MTT sur les lignées RL-95-2, Ishikawa et EN-1078D. Les cellules ont été soumises à différentes doses d'ocytocine (0; 0,01; 0,1; 1 et 10  $\mu$ M) pour 24h (A), 48h (B) et 72h (C). Les résultats graphiques représentent la moyenne  $\pm$  E.T. de quatre expériences indépendantes statistiquement non significatives;  $p > 0,05$ .

### 4.3.3 L'ocytocine augmente l'invasivité cellulaire via l'activation de la voie de PI 3-K

Nous avons investigué l'effet de l'OT sur l'invasivité des cellules de la lignée Hec-1-A qui expriment peu de propriétés invasives dans des conditions basales. Nous avons obtenu une augmentation de l'invasion de 46 % et 22 % des cellules Hec-1-A, après 24 heures d'exposition à 1 et 10  $\mu$ M d'OT respectivement (Figure 4.3 A). Parce que l'activation de ERK/MAPKinase, de PKA, et de PI 3-K peuvent être impliqués dans la réponse à l'OT (Cassoni et al., 2000; Krishnaswamy et al., 2010), nous avons émis l'hypothèse qu'au moins une de ces voies pourrait être impliquée dans l'augmentation de l'invasivité des cellules de Hec-1-A. Nous avons donc procédé à de nouveaux tests d'invasions avec Matrigel en traitant préalablement les cellules avec des inhibiteurs pharmacologiques. Nous avons utilisé comme inhibiteur de PI 3-K le LY294002 (20  $\mu$ M), le PD98059 (10  $\mu$ M) comme inhibiteur de MEK, le SB203580 (10  $\mu$ M) comme inhibiteur de p38 MAPK ainsi que le KT5720 (10  $\mu$ M) pour le PKA (Figure 4.3 B). Seul le LY294002, l'inhibiteur spécifique de PI 3-K, a réussi à bloquer totalement l'invasion des cellules Hec-1-A induite par l'OT (1  $\mu$ M) comparativement aux inhibiteurs de p38 MAPK (SB203580) et du PKA (KT5720). En ce qui concerne, l'inhibition de la voie de MEK par le PD98059, nos résultats révèlent une diminution de l'invasion de 46 % suggérant une participation de cette voie dans la réponse à l'ocytocine.

Dans les cellules endométriales, la phosphorylation d'Akt est un indicateur de l'activation de la voie de PI 3-K (St Germain et al., 2004a). Chez les cellules de la lignée Hec-1-A, dans des conditions basales, la phosphorylation d'Akt est peu ou pas détectable indiquant une voie de PI 3-K inactive. Nous avons donc vérifié que l'OT activait bel et bien cette voie (Figure 4.3 C-D). Ainsi, on peut constater que l'OT n'affecte pas vraiment l'expression de la protéine Akt mais entraîne plutôt sa phosphorylation/activation. Ces résultats indiquent que l'OT confère des propriétés invasives aux cellules du carcinome endométrial en partie via l'activation de la voie de PI 3-K/Akt.



**Figure 4.3 :** L'invasivité des cellules de Hec-1-A en réponse à l'ocytocine est augmentée via la voie de PI 3-K/Akt.

L'invasivité des cellules Hec-1-A en réponse à l'OT a été déterminé à l'aide du test d'invasion avec Matrigel A) sans prétraitement à 1 et 10 μM d'OT pendant 24 heures ou B) les cellules ont été prétraitées pendant 1 heure avec soit 20 μM de LY294002, 10 μM de PD98059, 10 μM de SB203580 ou 10 μM de KT5720 avant d'ajouter 1 μM d'OT pour 24 heures. Les résultats graphiques représentent la moyenne  $\pm$  E.T. de trois expériences indépendantes statistiquement significatives. \*  $p < 0,05$ . C) L'activation de PI 3-K/Akt en réponse à l'OT a été déterminée par analyses de type Western Blots via la phosphorylation d'Akt suite à une exposition de 24 heures à 1 et 10 μM d'OT. La β-actine est utilisée comme contrôle de normalisation de la quantité de protéines déposée sur le gel. D) L'analyse densitométrique des résultats obtenus en C. Les résultats graphiques représentent la moyenne  $\pm$  E.T. de trois expériences indépendantes statistiquement significatives. \*  $p < 0,05$ .



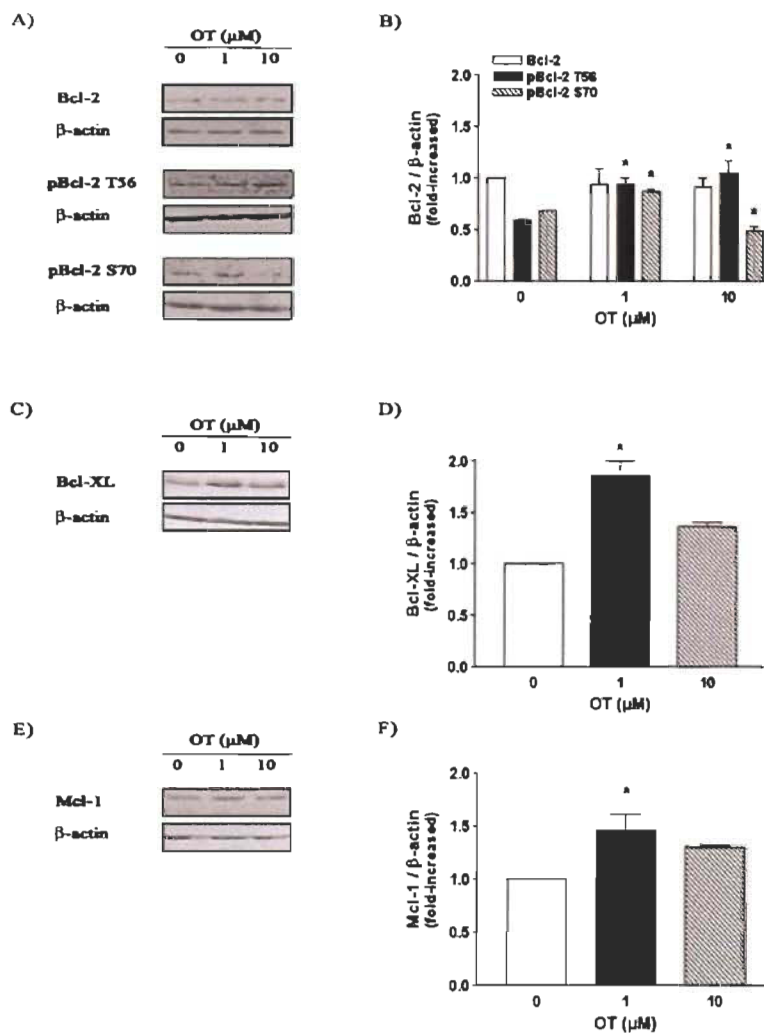
#### **4.3.4 L'ocytocine régule l'expression de la famille des Bcl-2 dans les cellules du carcinome endométrial**

Il a été rapporté que la voie que la protéine Akt peut réguler l'expression de Bcl-2 (Pugazhenthii et al., 2000; Rouette et al., 2012). Nous avons donc documenté si la réponse des cellules Hec-1-A à l'ocytocine implique cette voie. Nous avons observé que l'ocytocine n'influence pas l'expression de la protéine Bcl-2 tel qu'attendu mais augmente la phosphorylation de sa thréonine 56 et de sa sérine 70, deux sites de phosphorylation impliqués dans les fonctions antiapoptotiques de la protéine (Figure 4.4 A, B). Dans les mêmes conditions, les protéines Bcl-XL et Mcl-1 voient aussi leurs expressions augmenter (Figure 4.4 C, D, E, et F). L'expression de pBcl-2 Ser<sup>70</sup>, Bcl-XL ainsi que Mcl-1 est optimale à 1  $\mu$ M d'OT. La réponse obtenue par pBcl-2 Thr<sup>56</sup> et pBcl-2 Ser<sup>70</sup> à 10  $\mu$ M d'OT suggère un processus de régulation différent pour les deux sites de phosphorylation dans notre modèle. Finalement, ces résultats démontrent que la voie de Bcl-2 est impliquée dans la réponse à l'OT chez les cellules du carcinome endométrial Hec-1-A.

#### **4.3.5 L'ocytocine induit l'activation de la caspase-3 chez les cellules du carcinome endométrial**

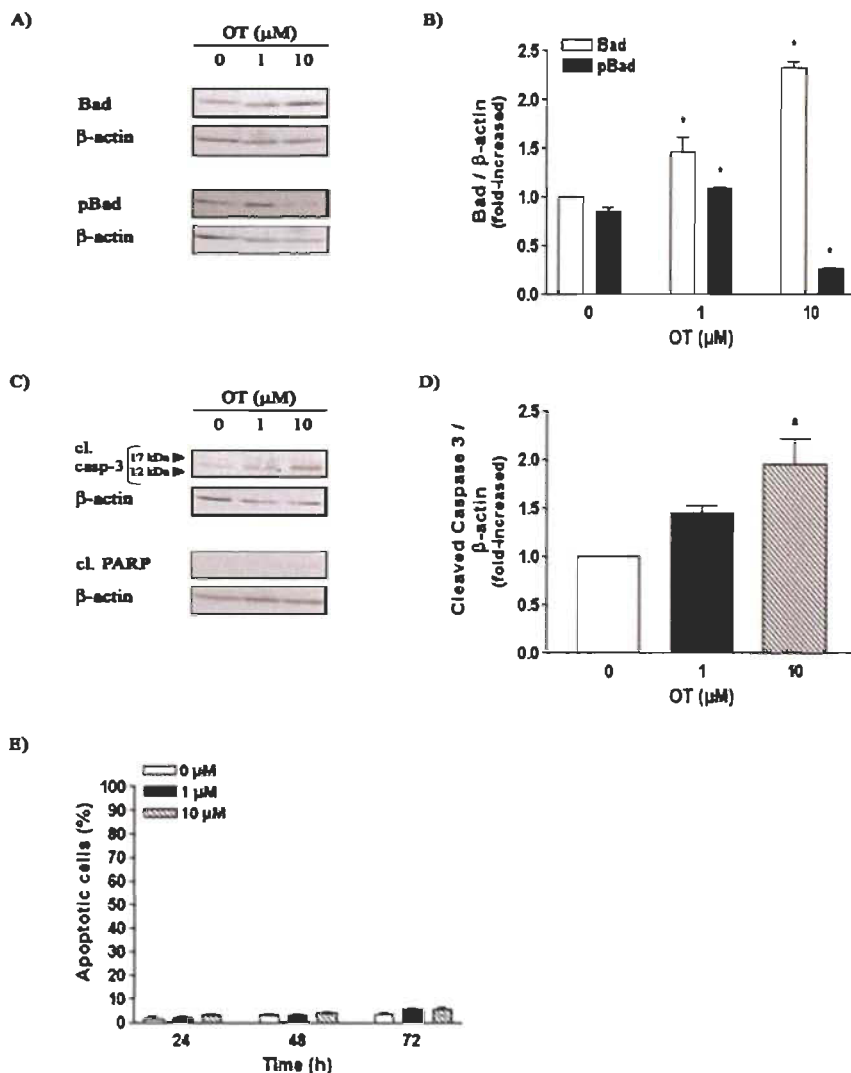
Akt peut aussi phosphoryler et bloquer l'activation de plusieurs protéines pro-apoptotiques tel que Bad (Hayakawa et al., 2000). Nous avons donc examiné la régulation de la phosphorylation de Bad en réponse à l'OT dans les cellules du carcinome endométrial Hec-1-A. Bad qui est exprimé constitutivement chez les cellules Hec-1-A voit son expression augmenter dramatiquement surtout lorsque les cellules sont exposées à 10  $\mu$ M d'OT (Figure 4.5 A, B). Aussi, nous avons observé que la phosphorylation de Bad sur la Ser136 diminue aussi radicalement à cette concentration d'OT malgré l'activation d'Akt, suggérant l'intervention d'une autre voie de signalisation ou d'un mécanisme d'inhibition. Suite à ces résultats, nous avons suspecté qu'un processus apoptotique était initié en réponse à l'OT. Bien que l'OT augmente le niveau de caspase-3 clivé chez les cellules Hec-1-A (Figure 4.5 C, D) aucun clivage de PARP n'a été observé ni d'augmentation significative du nombre de cellules

apoptotiques (Figure 4.5 E) suggérant que la voie de signalisation apoptotique est perturbée en aval de la caspase-3 effectrice.



**Figure 4.4 : Les effets de l'ocytocine sur la voie de Bcl-2 chez les cellules du carcinome endométrial Hec-1-A.**

L'effet de l'OT sur la protéine Bcl-2 et sa phosphorylation (A), sur Bcl-XL (C) et Mcl-1 (E) a été déterminé par analyses de type Western Blots suite à une exposition de 24 heures à 1 et 10 μM d'OT. La β-actine est utilisée comme contrôle de normalisation de la quantité de protéines déposée sur le gel. Alors que B, D et F représentent les analyses densitométriques des résultats obtenus en A, C et E. Les résultats graphiques représentent la moyenne ± E.T. de trois expériences indépendantes statistiquement significatives. \*  $p < 0,05$ .

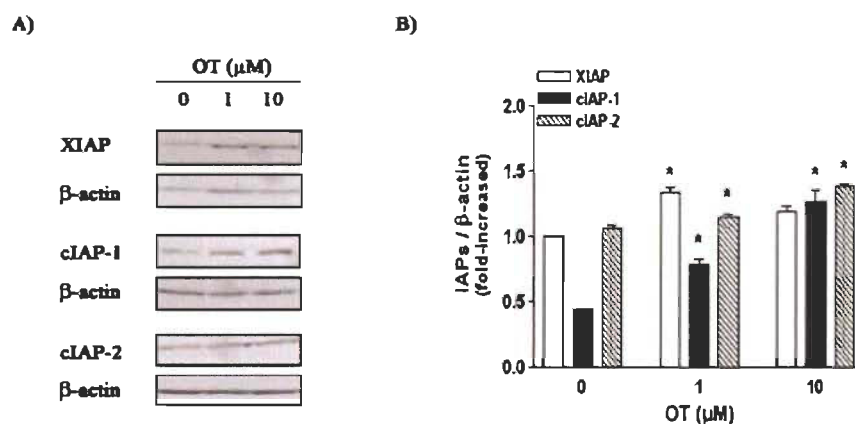


**Figure 4.5 :** L'ocytocine induit l'activation de la caspase-3 chez les cellules du carcinome endométrial Hec-1-A sans atteindre l'apoptose.

L'effet de l'OT sur la protéine Bad et sa phosphorylation (A, B), sur la caspase-3 clivée et PARP clivé (C, D) a été déterminé par analyses de type Western Blots ou par le marquage nucléaire au Hoescht (E) suite à une exposition de 24 heures à 1 et 10  $\mu\text{M}$  d'OT. La  $\beta$ -actine est utilisée comme contrôle de normalisation de la quantité de protéines déposée sur le gel. Les résultats graphiques représentent la moyenne  $\pm$  E.T. de trois expériences indépendantes statistiquement significatives. \*  $p < 0,05$ .

### 4.3.6 L'expression des IAPs est augmentée en réponse à l'ocytocine

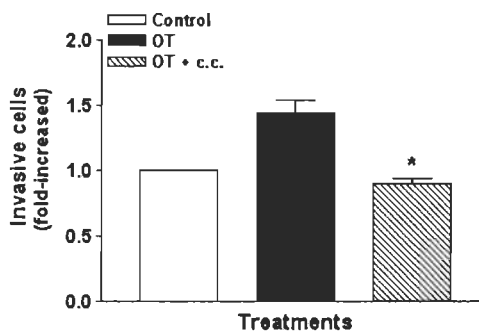
Les IAPs (inhibitors of apoptosis) peuvent bloquer la voie pro-apoptotique des caspases en se liant et inhibant l'activité des caspases effectrices (Deveraux et al., 1998). Nous avons donc caractérisé l'expression des IAPs en réponse à l'ocytocine chez les cellules Hec-1-A. XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 sont exprimées constitutivement et sous l'effet de l'ocytocine leurs expressions augmentent dramatiquement (Figure 4.6). Alors que XIAP atteint son expression maximale à 1  $\mu$ M, cIAP-1 et cIAP-2 voient leurs expressions augmenter d'une façon dose-dépendante. Ces résultats suggèrent que les IAPs, plus particulièrement cIAP-1 et cIAP-2, pourraient être impliquées dans l'inhibition tardive de la signalisation apoptotique induite par l'ocytocine alors que XIAP pourrait aussi jouer un rôle crucial dans l'invasivité.



**Figure 4.6 : L'ocytocine augmente l'expression des IAPs chez les cellules Hec-1-A.** (A) L'effet de l'OT sur XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 a été déterminé par analyses de type Western Blots suite à une exposition de 24 heures à 1 et 10  $\mu$ M d'OT. La  $\beta$ -actine est utilisée comme contrôle de normalisation de la quantité de protéines déposée sur le gel. Les résultats graphiques représentent la moyenne  $\pm$  E.T. de trois expériences indépendantes statistiquement significatives. \*  $p < 0,05$ .

#### 4.3.7 PKC est impliqué dans l'augmentation de l'invasivité en réponse à l'ocytocine chez les cellules du carcinome endométrial

Il a été démontré que PKC pouvait être impliqué dans l'augmentation de l'invasivité des cellules endométriales, dans la régulation de Bcl-2 et dans des mécanismes de résistance à divers agents apoptotiques (Rouette et al., 2012; Van Themsche et al., 2007; Van Themsche et al., 2008). Nous avons donc examiné si l'augmentation de l'invasivité des cellules Hec-1-A suite à l'exposition à l'ocytocine pouvait impliquer l'activation de PKC. Les résultats ont démontré que l'inhibiteur de PKC, le chelethrine chloride, a totalement bloqué l'invasion des cellules soumises à 1  $\mu$ M d'OT pendant 24 heures (Figure 4.7). Ces résultats indiquent que l'OT confère des propriétés invasives aux cellules du carcinome endométrial via l'activation de la PKC.



**Figure 4.7 :** L'invasivité des cellules de Hec-1-A en réponse à l'ocytocine est dépendante de l'activation de PKC.

L'invasivité des cellules Hec-1-A en réponse à l'OT a été déterminé à l'aide du test d'invasion avec Matrigel. Les cellules ont été prétraitées pendant 1 heure en présence ou en absence de 2  $\mu$ M de chelethrine chloride (c.c.) avant d'ajouter 1  $\mu$ M d'OT pour 24 heures. Les résultats graphiques représentent la moyenne  $\pm$  E.T. de trois expériences indépendantes statistiquement significatives. \*  $p < 0,05$ .

## CHAPITRE V

### DISCUSSION GENERALE

#### 5.1 Discussion et perspectives futures

##### 5.1.1 La caractérisation d'un nouveau modèle d'études : EN-1078D

En Amérique du Nord, le cancer de l'endomètre occupe le premier rang des cancers gynécologiques à survenir chez la femme. Statistiquement au Canada, en 2012, cela représente 5300 nouveaux diagnostics et environ 900 décès (Société Canadienne du Cancer et al., 2012). Considéré comme un cancer hautement curable lorsqu'il est diagnostiqué tôt, la présence de métastases diminue les chances d'y survivre à moins de 20 % (Jemal et al., 2010). Afin d'améliorer les traitements pour ces patientes, une meilleure compréhension des facteurs impliqués dans le phénotype métastatique du carcinome endométrial est donc nécessaire ainsi que le développement de nouveaux modèles d'études. Bien que quelques lignées cellulaires du carcinome endométrial soient disponibles pour des études *in vitro* (Kuramoto et al., 1972; Nishida, 2002; Way et al., 1983) et que certaines ont démontré leur capacité à former des tumeurs et/ou des métastases *in vivo*, très peu de lignées du cancer endométrial dérivent directement de cellules métastatiques (DAWE et al., 1964; Richardson et al., 1984). Cette constatation nous a conduit à caractériser EN-1078D, une nouvelle lignée alors fraîchement établie du carcinome endométrial qui présentait des attributs particuliers soient d'avoir été isolée à partir d'une métastase ovarienne, d'être particulièrement invasive et pauvrement différenciée.

##### 5.1.1.1 Le potentiel invasif et métastatique de la lignée EN-1078D

L'origine utérine des métastases ovariennes a été déterminée par des études histologiques et immunohistochimiques qui ont permis d'écarter la possibilité d'un

cancer primaire du côlon, du sein ou du col de l'utérus ayant métastaté à l'ovaire (Miller, 2011; Mittal et al., 2008). Afin d'évaluer les propriétés invasives *in vitro* de la nouvelle lignée, nous avons utilisé un test d'invasion avec Matrigel et déterminé l'expression de quelques métalloprotéases matricielles communément appelées MMPs (Matrix metalloproteinases) normalement impliquées dans le processus métastatique. Nos résultats ont démontré qu'effectivement les cellules de la lignée EN-1078D sont invasives dans des conditions expérimentales et qu'elles expriment constitutivement l'ARNm de la MMP-2 et de son activateur la MMP-14 ainsi que de très bas niveau des inhibiteurs des MMPs, les TIMP-1 et TIMP-2, ce qui serait consistant avec un carcinome endométrial hautement invasif (Ferguson et al., 2004). L'équipe de Graesslin (Graesslin et al., 2006) a démontré aussi qu'il existait une corrélation entre de bas niveaux d'expression de TIMP-2 et l'invasion métastatique du myomètre, de l'espace lympho-vasculaire et des ganglions lymphatiques avoisinants.

Bien qu'une grande partie de l'étude métastatique se déroule avec des modèles *in vitro*, la nature du processus métastatique requière aussi l'utilisation de système biologique plus complexe tel que le modèle animal. Nous avons ainsi documenté la tumorigénicité de la nouvelle lignée en procédant à des xénogreffes sous-cutanées chez des souris nude. Toutes les souris nude sans exception ont développé de grosses tumeurs avec un volume minimal de 350 mm<sup>3</sup> après 8 semaines d'inoculation et aucune métastase macroscopique n'a été observée à la rate, aux poumons ou au foie lors de la nécropsie. Ceci ne suggère aucunement que les cellules de EN-1078D ne sont pas aptes à la métastase dans un hôte animal mais seulement que la méthode d'inoculation sous-cutanée n'est pas adaptée pour cette réponse. La méthode standard, bien qu'elle exige des compétences considérables, consiste à injecter les cellules tumorales directement dans la circulation systémique via la veine latérale située dans la queue des souris afin que les cellules aux propriétés métastatiques colonisent les poumons (Khanna and Hunter, 2005; Hatakeyama et al., 2010). Afin de pouvoir déterminer si la lignée EN-1078D est un bon modèle métastatique *in vivo* chez l'animal, il serait nécessaire de reprendre des essais d'injections intraveineuses. De par sa provenance, le caractère et les

propriétés métastatiques de ce carcinome endométrial chez l'humain ne font certainement aucun doute.

#### ***5.1.1.2 La présence des récepteurs stéroïdiens sexuels chez les cellules de la lignée EN-1078D***

Dans l'endomètre normal, les hormones stéroïdiennes contrôlent la progression du cycle menstruel. Les oestrogènes stimulent la prolifération de l'épithélium glandulaire - qui est le plus fréquemment impliqué dans le cancer endométrial - alors que la progestérone contrecarre l'effet des oestrogènes. L'équilibre entre l'activité des oestrogènes et de la progestérone doit donc être minutieusement maintenu car la surexposition aux oestrogènes ou la perte de l'activité antagoniste de la progestérone stimulent l'oncogénèse (Yang et al., 2011). Les récepteurs stéroïdiens sexuels jouent donc un rôle crucial dans le développement du cancer de l'endomètre. Les cellules de la nouvelle lignée EN-1078D expriment les deux récepteurs à l'œstrogène, c'est à-dire ER $\alpha$  et ER $\beta$ , alors que la plupart des lignées du cancer endométrial disponibles actuellement expriment seulement un seul type de ces récepteurs. Aussi, les cellules EN-1078D expriment seulement le récepteur à la progestérone de type B (PR-B) qui est un puissant agent de régulation de la prolifération (Gao et al., 2000; Vegeto et al., 1993). L'expression du PR-B seul est retrouvée seulement chez les cellules tumorales et est caractéristique d'une tumeur de grade avancé (Arnett-Mansfield et al., 2001). Une étude de Fujimoto et Ishigo (Fujimoto et al., 1997) a rapporté que dans toutes les lésions métastatiques du cancer endométrial, l'ARNm de PR-B était majoritairement exprimé alors que celui de PR-A était supprimé, ce qui est en accord avec nos résultats. La perte de l'activité antagoniste de la progestérone dans le cancer de l'endomètre (Vegeto et al., 1993) jumelée avec l'expression de certaines MMPs pourrait être reliée au potentiel métastatique des cellules EN-1078D. Avec la présence des trois types de récepteurs stéroïdiens sexuels fonctionnels, la lignée EN-1078D peut être un modèle intéressant pour étudier l'influence des hormones sexuelles sur le phénotype métastatique.



### 5.1.1.3 *L'étude des mutations dans la nouvelle lignée EN-1078D*

Les mutations les plus fréquemment observées dans les cancers endométriaux sont celles affectant K-Ras dans 10 à 30 % des cas (Sherman, 2000), PTEN dans approximativement 50 % des cancers endométriaux (Risinger et al., 1997; Risinger et al.; Tashiro et al., 1997) et l'amplification de Her-2/neu qui est retrouvée dans 12 à 22 % des tumeurs (Mariani et al., 2005) (Deligdisch and Holinka, 1987).

Plusieurs études ont rapporté que la majorité des mutations à survenir chez K-Ras affectent le codon 12 avec une transversion d'une guanine (G) par une thymine (T) comme celle retrouvée chez les cellules EN-1078D. Cette mutation survient principalement chez la population Nord-Américaine (Cho et al., 1997). Les mutations de K-Ras sont aussi présentes dans les hyperplasies de l'endomètre suggérant que l'activation de K-Ras représenterait un évènement à survenir très tôt dans le développement du cancer endométrial (Enomoto et al., 1991). Les mutations de l'oncogène Ras entraînent une croissance cellulaire autonome (Barbacid, 1987) en augmentant l'activité transcriptionnelle du récepteur ER qui est normalement induit par les oestrogènes et le tamoxifène (Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995). Il existerait une corrélation significative entre l'expression des récepteurs à la progestérone, qui sont ER-dépendants, et les mutations activatrices de K-Ras suggérant que l'augmentation de l'activité de ER suite à sa phosphorylation par l'activation mutationnelle de la cascade Ras-MAPK pourrait être un des mécanismes responsable de l'indépendance aux hormones que développent certains cancers de l'endomètre (Niederacher et al., 1999).

Nous avons identifié deux sites de mutations du gène PTEN dans le domaine C-terminal chez les cellules de la nouvelle lignée EN-1078D. Ce domaine, dans lequel plus de 43 % des mutations de PTEN survient, contient plusieurs sous-domaines très importants qui sont communs avec d'autres molécules de signalisations (Waite and Eng, 2002). Le domaine C2 est associé avec une région qui se lie aux phospholipides (Lee et al., 1999) et qui a été identifié chez plusieurs protéines impliquées dans la transduction de signaux et dans la localisation membranaire (Rizo and Sudhof, 1998). La queue en C-terminale contient aussi une séquence PEST qui est critique pour la stabilité de la

protéine PTEN (Georgescu et al., 1999). Cette séquence est retrouvée chez les protéines qui possèdent une courte demi-vie intracellulaire et agirait probablement comme un signal pour la dégradation de la protéine. Paradoxalement, la délétion de cette séquence diminue l'expression de la protéine PTEN plutôt que d'augmenter son temps de demi-vie. Nos analyses ont révélé que cette séquence contient une mutation chez les cellules EN-1078D. PTEN antagonise la voie de signalisation de PI 3-K/Akt en déphosphorylant le PIP<sub>3</sub> (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate) ce qui diminue la translocation d'Akt vers la membrane cellulaire et subséquemment son activation. L'expression de PTEN dans les cellules diminue donc les niveaux de phospho-Akt, qui est la forme active d'Akt, et augmente l'apoptose (Davies et al., 1998; Myers et al., 1998). Les lignées du cancer endométrial qui possèdent un PTEN muté telles que les lignées bien connues RL-95-2 et Ishikawa, expriment beaucoup phospho-Akt (Gagnon et al., 2003; St Germain et al., 2004b; St Germain et al., 2004a). Cependant, la nouvelle lignée EN-1078D exprime peu ou pas du tout de phospho-Akt malgré la présence d'un PTEN muté ce qui suggère que la simple mutation de PTEN dans cette lignée n'est pas suffisante pour l'activation constitutive d'Akt.

L'amplification du gène Her-2/neu est associée à la progression tumorale et l'invasion locale dans le cancer de l'endomètre (Choudhury and Kiessling, 2004; Hetzel et al., 1992; Lazar et al., 1998; Rolitsky et al., 1999). La surexpression de p185<sup>neu</sup>, qui est une protéine codée par le gène Her-2/neu, serait impliquée dans la chimiorésistance en activant les voies de PI 3-K/Akt et NF-κB (Zhang et al., 2011). Également, un lien entre le niveau d'amplification du gène et/ou la surexpression de sa protéine avec un grade avancé et un cancer invasif a été maintes fois rapporté (Jimenez et al., 2001; Kolla et al., 2008; Tsai et al., 1996). Lors de notre analyse cytogénétique le gène Her-2/neu, situé sur le chromosome 17, ne s'est pas révélé être amplifié dans les cellules EN-1078D avec une seule copie du gène présent par chromosome. Toutefois, l'activité des facteurs de transcriptions peut résulter en une surexpression de la protéine de Her-2/neu même en l'absence d'amplification du gène. Aussi, ayant constaté que la proportion de cellules de la lignée présentant une trisomie du chromosome 17 augmente dans le temps, passant de

10 à 48 % après 20 passages, il pourrait être pertinent alors d'évaluer l'expression de la protéine p185<sup>neu</sup> par simple analyse de type Western Blots.

Afin de compléter le tableau des mutations les plus fréquemment retrouvés dans les carcinomes endométriaux, il serait bien éventuellement de procéder au séquençage de p53 de la nouvelle lignée. p53 agit comme un facteur de transcription en réponse à divers stress cellulaires afin de réguler les gènes qui induisent l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN ou pour déclencher le processus apoptotique. Les mutations du suppresseur de tumeur p53, qui est considéré comme le gardien du génome, sont les altérations moléculaires les plus communes dans tous les types de cancers chez l'humain et sont retrouvées selon le grade de la maladie dans environ 4 à 49 % des carcinomes endométriaux (Lee et al., 2010; Berchuck et al., 1994).

#### ***5.1.1.4 La résistance aux agents chimiothérapeutiques communément utilisés dans le traitement du cancer endométrial***

La nouvelle lignée EN-1078D est issue d'un adénocarcinome endométrial de stade III C, c'est à-dire une tumeur qui a envahi complètement le corps et le col de l'utérus, les trompes de Fallopes ainsi que les tissus avoisinants dans la région pelvienne tels que les ganglions lymphatiques et a complètement remplacé les ovaires. C'est un cancer de grade 3, c'est à-dire un cancer pauvrement différencié avec plus de 50 % des cellules qui sont anormales et qui se multiplient rapidement (Rahaman and Cohen, 2006). Dans des conditions de laboratoires, cette lignée double sa population de cellules en moyenne toutes les quinze heures. C'est donc une lignée provenant d'un cancer avancé et agressif. Nous avons donc été surpris de constater que les cellules EN-1078D sont sensibles aux deux agents chimiothérapeutiques les plus couramment utilisés dans le traitement du cancer de l'endomètre: le cisplatine et la doxorubicine. Brièvement, ces deux composés causent des dommages à l'ADN, le cisplatine en créant des liens covalents entre les bases guanines et/ou adénines inhibant ainsi la réplication de l'ADN, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire en G<sub>2</sub> et/ou la mort cellulaire (Sorenson et al., 1990) tandis que la doxorubicine inhiberait entre autre la topoisomérase II, enzyme nécessaire à la topologie et réparation de l'ADN (Burden and Osherooff, 1998). Des études ont constaté qu'il

pourrait exister une certaine causalité entre la chimiorésistance des cellules avec la durée de la phase S et le temps de doublement des cellules cancéreuses (Guo et al., 2008; Tsai et al., 1996). Ainsi selon ces études, la chimiosensibilité des cellules de EN-1078D observée en présence des deux agents anticancéreux étudiés pourrait être favorisée par le fait que les cellules de cette lignée se répliquant rapidement leur phase S du cycle cellulaire est raccourcie diminuant par conséquent leur capacité de réparer les dommages causés à l'ADN comparativement à d'autres lignées dont la prolifération est moins rapide.

Plus concrètement, de nombreuses études ont démontré que la voie de signalisation de PI 3-K/Akt était impliquée dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques (Gagnon et al., 2004; Gagnon et al., 2008; Clark et al., 2002; Knuefermann et al., 2003). La résistance à ces agents serait en partie attribuable à de haut niveau de phosphorylation/activation de la protéine Akt. Lors de la caractérisation de notre lignée, nous avons donc examiné le niveau de phosphorylation de cette protéine. Nos résultats ont démontré que la lignée EN-1078D exprime peu ou pas du tout de phospho-Akt malgré la présence d'une protéine PTEN mutée. L'absence de phosphorylation de la protéine Akt aurait peut-être pu expliquer en partie la chimiosensibilité des cellules EN-1078D comparativement à d'autres lignées mais l'étude de Gagnon et al. (Gagnon et al., 2008) a démontré que les cancers de l'endomètre de grade III, pour une raison encore inconnue, expriment peu ou pas du tout de phospho-Akt, ce qui abonde dans le même sens que nos résultats. Considérant ces faits, la lignée EN-1078D pourrait s'avérer un outil très intéressant afin de mieux comprendre les mécanismes de la perte de la phosphorylation d'Akt et de la chimiorésistance dans les cancers de l'endomètre de grade III.

### **5.1.2 Le rôle de l'ocytocine dans l'invasion des cancers endométriaux**

L'ocytocine est une petite hormone classiquement connue pour son rôle dans les fonctions reproductives (parturition, allaitement, développement du comportement sexuel et maternel) (Blanks and Thornton, 2003; Chandrasekher and Fortune, 1990;

Einspanier et al., 1995; Einspanier et al., 1997; Flint et al., 1994; Gimpl and Fahrenholz, 2001; Kiss and Mikkelsen, 2005) mais de récentes découvertes suggèrent que l'ocytocine pourrait aussi être impliquée dans une grande variété de processus physiologiques. En effet, le récepteur de l'ocytocine a été identifié dans plusieurs organes périphériques (Blanks and Thornton, 2003; Frayne and Nicholson, 1998; Gimpl and Fahrenholz, 2001; Ivell et al., 1997; Jankowski et al., 1998; Lefebvre et al., 1992a; Lefebvre et al., 1992b) et dans une grande variété de cellules cancéreuses où l'OT pourrait réguler la prolifération cellulaire selon le type de cancer. L'OT est aussi connue pour être régulée par les oestrogènes (Richard and Zingg, 1990) et stimuler la production des prostaglandines plus particulièrement la PGE<sub>2</sub> au niveau de l'épithélium glandulaire de l'endomètre (Asselin et al., 1996; Copland et al., 1999b; Tithof et al., 2007). Nous nous sommes donc interrogés sur les possibilités que l'OT, au-delà de son effet prolifératif/inhibiteur, puisse être impliquée dans l'invasivité des cellules du cancer endométrial via la régulation de certains facteurs d'agressivité tumorales tels que COX-2/PGE<sub>2</sub>, PI 3-K/Akt et XIAP.

#### **5.1.2.1 La distribution du récepteur de l'ocytocine (OTR)**

Nous avons déterminé la présence du récepteur à l'ocytocine *in vitro* chez les différentes lignées du cancer endométrial usuelles dans notre laboratoire, c'est à-dire Ishikawa (bien différenciée, grade I), RL-95-2 (modérément différenciée, grade II) ainsi que Hec-1-A, KLE et la nouvelle lignée EN-1078D (pauvrement différenciées, grade III). Toutes les lignées analysées expriment abondamment le récepteur OTR à l'exception des cellules KLE.

Nous avons aussi déterminé la présence du récepteur OTR *in vivo*, en utilisant des coupes de tissus à différents grades de la maladie mais aussi de tissus sains. Dans l'endomètre normal cyclé, le récepteur OTR est sous la régulation des hormones sexuelles stéroïdiennes et le récepteur est fortement exprimé au cours de la phase lutéale (Fuchs et al., 1985). Ce n'est donc pas surprenant que nous n'ayons observé aucun signal ou un signal très faible par la technique d'immunofluorescence, validé par la suite

par immunohistochimie, sur les échantillons de tissus d'endomètres normaux. Par contre, l'immunoréactivité du récepteur OTR était fortement exprimé dans les tissus tumoraux de grade I et II et un peu moins au niveau du grade III, ce qui est consistant avec nos observations chez les lignées cellulaires du cancer endométrial. Le récepteur OTR est exprimé plus particulièrement au niveau des cellules épithéliales et du compartiment glandulaire peu importe le grade, ce qui est cohérent avec un rôle pour le récepteur dans l'invasivité des cellules endométriales. Ces résultats démontrent que le récepteur OTR est largement distribué et suggèrent que sa présence pourrait jouer un rôle important dans la progression tumorale et la métastase en présence d'ocytocine.

#### ***5.1.2.2 L'effet de l'ocytocine sur la prolifération et l'invasion des lignées du cancer endométrial***

L'équipe de Cassoni (Cassoni et al., 2000; Cassoni et al., 2004) a rapporté que l'ocytocine pouvait inhiber la prolifération cellulaire des carcinomes endométriaux de 30 à 52 % selon le temps d'exposition et la concentration d'OT utilisée et ce, sans induire de processus apoptotique. L'inhibition rapportée serait dose-dépendante. Cette étude ayant été réalisée à partir d'une seule lignée du carcinome endométrial, les cellules COLO-684, nous avons donc documenté l'effet de l'ocytocine sur la prolifération cellulaire sur nos différentes lignées possédant le récepteur OTR (Hec-1-A, RL-95-2, Ishikawa et EN-1078D). Contrairement aux résultats attendus, nous n'avons observé aucun effet significatif de l'ocytocine sur la prolifération de nos lignées même après 72 heures d'exposition à des concentrations similaires de  $10^{-8}$  M et  $10^{-7}$  M d'OT. Bien que la méthodologie utilisée soit un peu différente entre les deux études, il est tout-à-fait plausible que la lignée COLO-684 soit simplement plus sensible à l'effet de l'ocytocine que les quatre lignées que nous avons analysées. Les cellules du carcinome endométrial humain sont donc résistantes à l'effet prolifératif ou inhibitif de l'ocytocine.

Nous avons utilisé pour la suite de notre étude sur l'ocytocine les lignées Hec-1-A et Ishikawa qui sont couramment utilisées comme modèle du cancer de l'endomètre. Ces lignées qui sont évidemment positives pour le OTR sont également peu invasives dans des conditions basales et sont résistantes à plusieurs molécules pro-apoptotiques telles

que le TGF- $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Van Themsche et al., 2007; Van Themsche et al., 2008). Malheureusement, nous n'avons pas pu utiliser la lignée EN-1078D dans cette étude puisque ses cellules n'expriment aucun des récepteurs à la PGE<sub>2</sub> (Sexton et al., 2006).

Il a été rapporté que l'ocytocine pouvait stimuler la migration et l'invasion des cellules endothéliales humaines (Cassoni et al., 2006; Cattaneo et al., 2008). Nous avons donc examiné cette capacité de l'ocytocine et avons démontré, pour la première fois, que l'ocytocine pouvait effectivement induire l'invasion des cellules du cancer endométrial humain. Cependant, l'effet de l'ocytocine sur l'invasion n'est pas le même pour tous les types de tissus. Il a été rapporté que l'ocytocine pouvait inhiber la prolifération, la migration et l'invasion des cellules du cancer ovarien *in vitro* et *in vivo* (Morita et al., 2004). Cette différence dans les résultats avec les cellules du cancer endométrial pourrait être spécifique au tissu mais aussi pourrait être attribuable aux doses différentes d'ocytocine utilisées entre les deux études. Aussi, il serait intéressant lors d'une prochaine étude d'évaluer *in vivo* l'invasivité induite par l'ocytocine chez les cellules cancéreuses de l'endomètre.

#### ***5.1.2.3 Le rôle des cyclooxygénases et de la PGE<sub>2</sub> dans l'invasion induite par l'ocytocine***

La cyclooxygénase-2 (COX-2 ou PTGS2) joue un rôle non seulement dans la maintenance de l'endomètre lors du cycle menstruel mais serait aussi impliquée dans la progression et l'invasion du cancer endométrial (Ohno et al., 2005). Nous avons donc examiné le rôle des cyclooxygénases et de la voie de PGE<sub>2</sub>-EP dans l'invasion induite par l'ocytocine dans les cellules du carcinome endométrial. Il est maintenant bien accepté que la production des prostaglandines (PGs) par les cellules épithéliales de l'endomètre, dans des conditions basales, est sous le contrôle de la cyclooxygénase-1 (COX-1 ou PTGS1) qui est exprimée constitutivement tandis que la production de prostaglandines suite à une stimulation est tributaire de la COX-2 qui est induite (Parent et al., 2003). Nos résultats abondent dans ce sens avec l'expression constitutive de COX-1 et très peu ou pas de COX-2 et de PGE<sub>2</sub> dans des conditions basales chez les cellules du carcinome endométrial. En réponse à l'ocytocine, les deux isoformes des

cyclooxygénases ainsi que la production de PGE<sub>2</sub> sont augmentées significativement. Ces résultats suggèrent que la production de PGE<sub>2</sub> induite par l'ocytocine est régulée via l'augmentation de l'expression de COX-2 plutôt que par COX-1. De plus, nous avons démontré que l'ocytocine augmente l'invasion des cellules du carcinome endométrial par la production de PGE<sub>2</sub> et via le récepteur EP1.

L'augmentation de la COX-1 en réponse à l'ocytocine, nous a quand même intrigué. Nous avons donc examiné la contribution de chacun des isoformes des cyclooxygénases dans l'invasion induite par l'ocytocine en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques. Nos résultats démontrent que l'inhibition individuelle de chacun des deux isoformes COX-1 et COX-2, est suffisante pour contrecarrer l'augmentation de l'invasion en réponse à l'ocytocine suggérant une action synergique entre les deux COXs. Lors de précédentes études dans notre laboratoire, nous avons démontré que la protéine Akt pouvait réguler l'expression de la COX-2 (St Germain et al., 2004b; St Germain et al., 2004a). Nous avons donc investigué si la stimulation des COXs par l'ocytocine impliquait la voie de signalisation de PI 3-K/Akt. L'augmentation de l'expression des deux cyclooxygénases suite à l'exposition à l'ocytocine de même que l'invasion ont été inhibées par l'utilisation du LY294002, qui est un inhibiteur de PI 3-K. Aussi, nous avons noté que l'ocytocine induisait la phosphorylation/activation d'Akt dans les cellules du cancer de l'endomètre, également inhibée par le LY294002. Cela suggère fortement que la voie de PI 3-K/Akt joue un rôle central dans l'invasion des cellules endométriales en réponse à l'ocytocine. Finalement, il a été rapporté que la PGE<sub>2</sub> stimulait la migration cellulaire via l'activation d'Akt (Buchanan et al., 2003) évoquant la possibilité d'une action en boucle autocrine/paracrine de COX-2/PGE<sub>2</sub>/Akt dans notre système.

L'implication de la voie de COX-2/PGE<sub>2</sub>/MMP dans l'augmentation de la migration et l'invasion cellulaire a déjà été rapporté (Lee et al., 2007). Toutefois, ici nous démontrons non seulement que les deux isoformes sont requis pour l'augmentation de l'activité de la MMP-2 et la MMP-14 mais que les deux cyclooxygénases agissent de concert. Ainsi, la COX-1 régule la MMP-14, qui est un des principaux activateurs de la



MMP-2 dans les tumeurs invasives (Mignon et al., 1995), alors que la COX-2 augmente l'expression de la MMP-2. À notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle collaboration entre les deux isoformes des cyclooxygénases afin de réguler les MMP-2 et MMP-14 est relatée. Une étude récente (Lau et al., 2010) a démontré que COX-1 et COX-2 jouaient un rôle essentiel dans la migration et l'invasion induite par la gonadotrophine chez les cellules du cancer ovarien humain supportant nos propres conclusions à savoir que l'expression des deux isoformes des cyclooxygénases sont critiques pour les propriétés invasives induites par l'ocytocine chez les cellules du carcinome endométrial.

#### ***5.1.2.4 Le rôle de XIAP dans l'invasion induite par l'ocytocine***

Nous avons récemment rapporté l'implication de XIAP dans la régulation de l'invasion des cellules du cancer de l'endomètre exposées au TGF- $\beta$  (Van Themsche et al., 2007) révélant que XIAP pourrait être un facteur clé dans l'invasivité des cellules du carcinome endométrial. Nous avons donc envisagé un possible rôle pour XIAP dans notre système. Nos résultats ont démontré qu'effectivement l'ocytocine augmente l'expression de XIAP dans les cellules du carcinome endométrial et ce d'une façon COX-2 dépendante, ce qui est consistant avec l'activation de la voie de NF- $\kappa$ B comme démontré par les travaux de St-Germain (St Germain et al., 2004b) et observé dans d'autres types cellulaires (Xiao et al., 2001). De plus, nous avons aussi constaté que XIAP est essentiel pour induire l'invasion des cellules du carcinome endométrial qui ont été exposées à l'ocytocine. XIAP est une protéine ubiquitaire connue pour son rôle protecteur contre l'apoptose en se liant et inhibant la voie des caspases (Deveraux et al., 1997). Bien qu'aucun effet toxique ou apoptotique n'ait été rapporté suite à l'exposition à l'ocytocine (Cassoni et al., 2000), il n'est pas surprenant que l'inhibition de XIAP, par interférence ARN, augmente le nombre de cellules apoptotiques. Ainsi, nous ne pouvons pas totalement exclure la possibilité qu'une partie de la réduction de l'invasion observée suite au «knockdown» de XIAP puisse être dû à l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques. Toutefois, ces résultats soulignent et mettent en évidence l'importance de XIAP dans l'invasion chez les cellules du carcinome endométrial. L'équipe de Mehrotra

(Mehrotra et al., 2010) a rapporté une coopération entre XIAP et la Survivin qui stimulerait l'invasion et la métastase en formant un complexe XIAP/Survivin capable d'activer NF- $\kappa$ B et ce, indépendamment de leur rôle anti-apoptique. Il pourrait être intéressant éventuellement d'examiner cette relation entre XIAP et la Survivin afin de déterminer l'impact de ce complexe sur l'invasion observée dans notre système de même que de déterminer si XIAP peut réguler l'expression des MMPs.

#### ***5.1.2.5 Les voies de signalisation impliquées dans l'invasion induite par l'ocytocine chez les cellules du cancer de l'endomètre***

Les mécanismes et les voies de signalisation impliqués dans la réponse à l'ocytocine ne sont toujours pas clairement établis à ce jour. Certaines équipes ont rapportées l'implication de la voie cAMP-PKA (Cassoni et al., 2004) mais surtout celle des MAP kinases (Krishnaswamy et al., 2010; Rimoldi et al., 2003; Strakova et al., 1998). Nous avons donc examiné si ces voies de signalisation étaient impliquées ou non dans l'invasion que nous avons observé suite à l'exposition des cellules du carcinome endométrial humain à l'ocytocine, et ce à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques. Cette étude nous a permis d'écarter, sans surprise, l'implication de la voie de cAMP-PKA dans notre système, voie surtout associée à l'effet inhibiteur de l'ocytocine sur la prolifération (Cassoni et al., 2000). Nous avons aussi utilisé deux inhibiteurs de la voie des MAP kinases afin d'évaluer la voie non classique de la p38 MAP kinase et la voie canonique de ERK1/2, ces deux voies étant en lien avec la production des prostaglandines via la cPLA<sub>2</sub> (Lin et al., 1993; Kramer et al., 1996). Ainsi, nous avons éliminé l'action de la p38 MAP kinase dans notre réponse alors que nous avons obtenu une réduction de l'invasion d'environ 45 % suite à l'inhibition de ERK1/2. L'inhibition de la PI 3-K, quant à elle, bloque totalement l'invasion de nos cellules suite à leur exposition à l'ocytocine. Ces résultats suggèrent un rôle central pour la voie de PI 3-K/Akt avec une certaine participation de la voie de ERK1/2 dans l'invasivité induite par l'ocytocine mais également que l'activation de la voie PI 3-K/Akt se situe en amont de l'activation de la voie de ERK1/2.

Parallèlement à la publication de nos travaux, l'équipe de Krishnaswamy (Krishnaswamy et al., 2010) a démontré que l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) était un intermédiaire obligatoire pour l'expression de la COX-2 et pour la production de PGF2 $\alpha$  chez les cellules endométriales bovines en réponse à l'ocytocine. Plus important encore, ils ont démontré que le EGFR pouvait simultanément activer la voie c-Src/ERK1/2 et PI 3-K ce qui est consistant avec nos résultats. Il serait important pour la suite de notre étude de documenter la participation et la transactivation de EGFR dans notre modèle d'invasion en lien avec la voie de COX-2/PGE<sub>2</sub>/PI3-K/Akt/XIAP ainsi que d'investiguer l'apport de ERK1/2 dans notre système.

Plusieurs études ont rapporté que la PKC était impliquée dans la régulation de la PLA<sub>2</sub>, dans l'invasivité cellulaire, dans le contrôle des MMPs, dans la régulation de Bcl-2 et la chimiorésistance ainsi que dans la réponse à l'ocytocine (Van Themsche et al., 2008; Zhang et al., 2004; Li et al., 2007; Copland et al., 1999b; Ku et al., 1995; Nishizuka, 1988; Rouette et al., 2012). Vraisemblablement, l'ocytocine exercerait ses fonctions via la voie PLC/PKC/c-Src/EGFR/ERK1/2 (Krishnaswamy et al., 2010; Molnar et al., 1999; Pequeux et al., 2004; Rimoldi et al., 2003; Strakova et al., 1998). Nous avons donc examiné l'effet de l'inhibition de la PKC sur l'invasion de nos cellules exposées à l'ocytocine à l'aide de la chelerythrine chloride, un inhibiteur des isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  de PKC. L'activation de la PKC est considérée comme un événement survenant tôt dans la cascade des signaux intracellulaires, il n'est donc pas surprenant que son inhibition ait totalement bloqué l'invasion de nos cellules. Bien que l'invasion soit induite aux deux concentrations d'ocytocine utilisées, nous avons noté qu'elle était maximale à 1  $\mu$ M d'OT avec une augmentation de 45 % comparativement à 22 % lorsque les cellules du carcinome endométrial sont exposées à 10  $\mu$ M d'OT, ce qui représente une diminution de l'invasion d'environ 50 %. Également, nous avons noté que la réponse de certaines protéines ou état de phosphorylation semblaient suivre ce même patron d'expression : il s'agit de la pBcl-2<sup>Ser70</sup>, de BCL-XL, Mcl-1 ainsi que XIAP. Les travaux de Huang (Huang et al., 2010) ont rapporté que l'inhibition de la PKC pouvait déphosphoryler la protéine Bcl-2 sur la sérine 70 sans altérer la phosphorylation de la thréonine 56, ce qui est consistant avec nos résultats. Aussi,

l'équipe de Wu (Wu et al., 2012) a démontré très récemment que l'inhibition de la PKC diminuait la phosphorylation/activation de ERK1/2, de NF- $\kappa$ B, de Bcl-XL ainsi que de XIAP. Les conclusions de ces travaux nous permettent de suspecter que la diminution de l'invasion observée à 10  $\mu$ M d'OT puisse être dû à un mécanisme d'inhibition de la PKC non identifié dans notre modèle. Étant donné que les inhibitions de PKC, PI 3-K et XIAP ont totalement bloqué le processus d'invasion comparativement à ERK1/2, il serait important de déterminer si PKC peut réguler la voie de PI 3-K/Akt et si PKC/ERK1/2 peut être impliqué dans la régulation de XIAP. L'ensemble de ces données semble indiquer que la PKC joue un rôle essentiel dans l'invasivité de nos cellules en réponse à l'ocytocine.

#### ***5.1.2.6 L'initiation du processus apoptotique induite par l'ocytocine dans les cellules cancéreuses de l'endomètre***

En examinant l'effet de l'ocytocine sur la voie de PI 3-K/Akt et ses cibles situées en aval, nous avons constaté que la protéine BAD était activée, suggérant l'initiation du processus apoptotique dans notre modèle. BAD est une des premières composantes de la machinerie apoptotique à être phosphorylé par Akt (Yang et al., 1997) ce qui entraîne sa séquestration par la protéine 14-3-3 et conséquemment son inactivation. Nos résultats démontrent une forte augmentation de l'expression de BAD et une réduction de sa phosphorylation, ce qui est en accord avec son activation. Nous avons donc investigué du côté des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 afin de vérifier si leurs expressions pouvaient contrecarrer celle de BAD. Plusieurs études ont rapporté qu'Akt, ERK1/2 et PKC pouvaient réguler l'expression de Bcl-2 en réponse à plusieurs stimuli (Villar et al., 2009; Itano et al., 1996; Deng et al., 2000; Shankar et al., 2010; Pugazhenthii et al., 2000; Rouette et al., 2012). Ainsi, l'ocytocine n'augmente pas l'expression de Bcl-2 telle qu'attendue mais plutôt sa phosphorylation/activation (Ser<sup>70</sup> et Thr<sup>56</sup>) alors que Bcl-XL et Mcl-1 voient leur expression augmenter suggérant une contre-balance anti-apoptotique à l'activation de BAD. Toutefois, il semble que cela ne soit pas suffisant pour s'opposer à l'action de BAD puisque nous avons détecté la présence de caspase-3 clivée/activée dans notre système. De plus, la présence de la caspase-3 clivée augmente d'une manière dose-dépendante suggérant un effet

cytotoxique produit par les concentrations d'ocytocine que nous avons utilisées lors de cette étude, soit 1 et 10  $\mu\text{M}$ . À la lumière de ces résultats, nous avons recherché la présence de fragments clivés de PARP qui est la principale cible de la caspase-3 activée. PARP est impliqué dans la réparation de l'ADN et son clivage est un important indicateur de l'achèvement et de l'irréversibilité du processus apoptotique (Oliver et al., 1998). Aucun fragment de PARP clivé n'a été détecté et aucune augmentation significative du nombre de cellules apoptotiques n'a été observée suite à l'exposition à l'ocytocine dans notre système suggérant qu'en dépit du fait que le processus apoptotique ait été initié un autre mécanisme cellulaire est venu interférer tardivement avec celui-ci et le désamorcer. XIAP qui est reconnue pour se lier et inhiber directement la caspase-3 (Deveraux et al., 1997) est augmentée en réponse à l'ocytocine dans les cellules du carcinome endométrial mais cette réponse est plus importante à 1  $\mu\text{M}$  qu'à 10  $\mu\text{M}$  d'OT. Nous avons donc examiné l'expression de cIAP-1 et cIAP-2 aussi reconnues pour bloquer la cascade des caspases (Xu et al., 2009). Nous avons constaté que l'expression de cIAP-1 et cIAP-2 augmentait suite à l'ocytocine de façon dose-dépendante et que cette augmentation était beaucoup plus marquée pour la protéine cIAP-1. Ces résultats suggèrent que cIAP-1 et dans une moindre proportion cIAP-2 seraient impliquées dans l'inhibition tardive de l'apoptose induite par l'ocytocine dans notre modèle alors que XIAP semblerait jouer un rôle plus actif dans le processus d'invasion. La diminution de l'expression de XIAP observée suite à l'exposition à 10  $\mu\text{M}$  d'OT, alors qu'il y a augmentation du clivage de la caspase-3, semble effectivement vouloir évincer la candidature de XIAP comme principal acteur dans l'inhibition tardive de l'apoptose dans notre système. Afin de valider cette hypothèse, il suffirait de procéder à une analyse de type siRNA de cIAP-1 et cIAP-2 aux concentrations d'ocytocine usuelles dans notre étude et de vérifier s'il y a ou non une augmentation de PARP clivé et du nombre de cellules apoptotiques, puis de comparer avec les résultats du siRNA de XIAP.

Comment expliquer la déphosphorylation de BAD malgré la présence d'Akt phosphorylé et activé dans notre système ? Il a été rapporté qu'une importante concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire pouvait induire l'apoptose via l'activation d'une

phosphatase calcium-dépendante, la calcineurine, qui déphosphorylerait BAD et entraînerait conséquemment l'activation de la caspase-3 (Wang et al., 1999; Springer et al., 2000). Aussi, l'activation du récepteur OTR stimule l'activité de la phospholipase C qui clive le  $\text{PIP}_2$  membranaire en DAG (diacyl glycerol) et en  $\text{IP}_3$ . Alors que le DAG participe à l'activation de la PKC, le  $\text{IP}_3$  est relâché dans le cytoplasme et se lie au réticulum endoplasmique afin de faire augmenter la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol, ce qui entraîne une cascade d'évènements et de changements intracellulaires (Gimpl and Fahrenholz, 2001). Il serait alors possible que 10  $\mu\text{M}$  d'OT soit une dose suffisante pour induire une certaine élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire stimulant cette fonction de la calcineurine qui initierait alors le processus apoptotique. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en utilisant un inhibiteur de la calcineurine telle que la cyclosporine ou un siRNA en présence d'OT et regarder ce qui se passe au niveau de l'expression de BAD et sa phosphorylation ainsi que de la caspase-3. De plus, afin de déterminer si cela est bel et bien dû à une certaine toxicité des doses utilisées dans notre étude, il s'agirait finalement de comparer les résultats obtenus avec ceux de concentrations plus faibles d'OT.

Également, il a été rapporté que la calcineurine pourrait aussi inhiber la voie de PKC/MAP kinase afin de réguler l'invasion cellulaire chez les kératinocytes (Kashyap and Rabinovitz, 2012). Il serait donc possible que la diminution de l'invasion observée lorsque les cellules sont exposées à 10  $\mu\text{M}$  d'OT ainsi que l'initiation du processus apoptotique soit en lien avec une inhibition de la PKC dans notre système suite à une suractivation de la calcineurine.

## 5.2 Conclusion

Dans le premier volet de nos travaux, nous avons caractérisé une nouvelle lignée du carcinome endométrial qui avait pour particularité d'avoir été isolée à partir d'une métastase et d'être issue d'un cancer de stade avancé (stade IIIC) et pauvrement différencié (grade III). Très peu de lignées du cancer endométrial disponibles comme modèle *in vitro* dérivent directement de métastases. Établie à partir d'une métastase

ovarienne, l'origine endométriale de la lignée EN-1078D a été confirmée. Au niveau des récepteurs sexuels stéroïdiens, la lignée a la spécificité d'exprimer les deux récepteurs à l'oestrogène ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ) et seulement le récepteur à progestérone B (PR-B). Nous avons aussi procédé à l'identification des mutations les plus fréquemment retrouvées dans les cancers endométriaux. Ainsi, les gènes K-Ras et PTEN sont mutés alors que le gène Her-2/neu n'est pas amplifié. Malgré la présence d'un PTEN muté, la lignée EN-1078D n'exprime pas ou très peu de phospho-Akt et démontre une chimiosensibilité au cisplatine et à la doxorubicine. Les cellules EN-1078D expriment les MMP-2 et MMP-14 et très peu de TIMP-2, sont très invasives et agressives *in vitro* et ont également démontré des capacités tumorigéniques *in vivo*. À la lumière de ces résultats, il semble que la nouvelle lignée EN-1078D pourra être utile comme modèle et contribuera à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le phénotype métastatique du cancer endométrial et leur régulation par les hormones stéroïdiennes sexuelles.

Dans le deuxième volet de nos travaux, nous nous sommes intéressés à l'effet de l'ocytocine sur les cellules du cancer de l'endomètre. Contrairement à ce qu'il avait été précédemment rapporté, l'ocytocine ne produit aucun effet prolifératif ou inhibitif sur les cellules cancéreuses endométriales. En revanche, nous rapportons pour la première fois que l'ocytocine peut induire l'invasion des cellules du cancer de l'endomètre et ce via la  $PGE_2$  et son récepteur EP1. L'invasion induite par l'ocytocine est tributaire de la participation de la COX-1, de la COX-2 ainsi que de XIAP qui semblent tous être dépendants de l'activation de la PI 3-K. Nos résultats indiquent que XIAP joue un rôle clé dans le processus d'invasion et que son expression/activité est assujettie à la régulation de COX-2. Nous avons également démontré pour la première fois que la COX-1 et la COX-2 agissent synergiquement dans la régulation des MMPs : la COX-1 régule l'expression de la MMP-14, le principal activateur de la MMP-2, alors que la COX-2 régule celle de la MMP-2. L'étude avec les inhibiteurs pharmacologiques nous a révélé que la PKC et la voie de PI 3-K/Akt jouent un rôle central dans l'invasivité induite par l'ocytocine mais aussi que la voie de ERK1/2 contribue en partie à cette réponse. De plus, nos résultats suggèrent que l'activation de la voie PI 3-K/Akt se situe

en amont de l'activation de la voie de ERK1/2. Bien que d'autres investigations soient nécessaires afin d'élucider les mécanismes et facteurs impliqués dans l'invasion des cellules du cancer endométrial en réponse à l'ocytocine, nos résultats suggèrent que la présence du récepteur OTR dans les cellules du cancer de l'endomètre devrait être considéré comme un important facteur impliqué dans la progression du cancer endométrial.

La disponibilité de nouveaux modèles d'études permet de mieux saisir les mécanismes qui participent au développement et à la progression du phénotype métastatique et ce, afin d'en identifier les différents acteurs. La caractérisation de la lignée du carcinome endométrial EN-1078D a été effectuée dans cette perspective. Aussi, nous avons mis en évidence un effet insoupçonné jusqu'alors de l'ocytocine sur les cellules du cancer de l'endomètre qui nous rappelle en fait toute la complexité du processus cancéreux et la nécessité de poursuivre la recherche afin d'offrir un meilleur pronostic de survie aux femmes atteintes d'un cancer endométrial présentant des métastases.



## RÉFÉRENCES

- Abbara A. Utérus. Association des Médecins Maîtres toile . 2009.
- ACOG. ACOG practice bulletin, clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists, number 65, August 2005: management of endometrial cancer. *Obstetrics & Gynecology* 2005; (106): 413.
- Adams J M, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; (281): 1322-1326.
- Aglund K, Rauvala M, Puistola U, Angstrom T, Turpeenniemi-Hujanen T, Zackrisson B, Stendahl U. Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer- MMP-9 correlates to the grade and the stage. *Gynecol Oncol* 2004; (94): 699-704.
- Aimes R T, Quigley J P. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 1995; (270): 5872-5876.
- Al Khouri A M, Ma Y, Togo S H, Williams S, Mustelin T. Cooperative phosphorylation of the tumor suppressor phosphatase and tensin homologue (PTEN) by casein kinases and glycogen synthase kinase 3beta. *J Biol Chem* 2005; (280): 35195-35202.
- Alessi D R, Cohen P. Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 1998; (8): 55-62.
- Alnemri E S, Livingston D J, Nicholson D W, Salvesen G, Thornberry N A, Wong W W, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; (87): 171.
- Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; (3): 917-921.
- Amico J A, Finn F M, Haldar J. Oxytocin and vasopressin are present in human and rat pancreas. *Am J Med Sci* 1988; (296): 303-307.
- Amico J A, Rauk P N, Cai H M. Estradiol and progesterone regulate oxytocin receptor binding and expression in human breast cancer cell lines. *Endocrine* 2002; (18): 79-84.

- Andjelkovic M, Alessi D R, Meier R, Fernandez A, Lamb N J, Frech M, Cron P, Cohen P, Lucocq J M, Hemmings B A. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem* 1997; (272): 31515-31524.
- Andjelkovic M, Jakubowicz T, Cron P, Ming X F, Han J W, Hemmings B A. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; (93): 5699-5704.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod J J, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou J C. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 1997; (277): 370-372.
- Arboleda M J, Lyons J F, Kabbinar F F, Bray M R, Snow B E, Ayala R, Danino M, Karlan B Y, Slamon D J. Overexpression of AKT2/protein kinase B $\beta$  leads to up-regulation of  $\beta$ 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2003; (63): 196-206.
- Arcaro A, Wymann M P. Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 1993; (296 ( Pt 2)): 297-301.
- Arehart E, Gleim S, Kasza Z, Fetalvero K M, Martin K A, Hwa J. Prostacyclin, atherothrombosis, and cardiovascular disease. *Curr Med Chem* 2007; (14): 2161-2169.
- Arnett-Mansfield R L, deFazio A, Wain G V, Jaworski R C, Byth K, Mote P A, Clarke C L. Relative expression of progesterone receptors A and B in endometrioid cancers of the endometrium. *Cancer Res* 2001; (61): 4576-4582.
- Asano K, Lilly C M, Drazen J M. Prostaglandin G/H synthase-2 is the constitutive and dominant isoform in cultured human lung epithelial cells. *Am J Physiol* 1996; (271): L126-L131.
- Ashby B. Co-expression of prostaglandin receptors with opposite effects: a model for homeostatic control of autocrine and paracrine signaling. *Biochem Pharmacol* 1998; (55): 239-246.
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; (2): 420-430.

- Asselin E, Drolet P, Fortier M A. Cellular mechanisms involved during oxytocin-induced prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  production in endometrial epithelial cells in vitro: role of cyclooxygenase-2. *Endocrinology* 1997; (138): 4798-4805.
- Asselin E, Goff A K, Bergeron H, Fortier M A. Influence of sex steroids on the production of prostaglandins F<sub>2</sub>  $\alpha$  and E<sub>2</sub> and response to oxytocin in cultured epithelial and stromal cells of the bovine endometrium. *Biol Reprod* 1996; (54): 371-379.
- Auger K R, Serunian L A, Soltoff S P, Libby P, Cantley L C. PDGF-dependent tyrosine phosphorylation stimulates production of novel polyphosphoinositides in intact cells. *Cell* 1989; (57): 167-175.
- Bader A G, Kang S, Zhao L, Vogt P K. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005; (5): 921-929.
- Baker A H, Edwards D R, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; (115): 3719-3727.
- Balendran A, Casamayor A, Deak M, Paterson A, Gaffney P, Currie R, Downes C P, Alessi D R. PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr Biol* 1999; (9): 393-404.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; (357): 539-545.
- Baluk P, Raymond W W, Ator E, Coussens L M, McDonald D M, Caughey G H. Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression increases in Mycoplasma-infected airways but is not required for microvascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; (287): L307-L317.
- Bao Q, Shi Y. Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 2007; (14): 56-65.
- Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; (56:779-827.): 779-827.
- Barrett A J, Starkey P M. The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J* 1973; (133): 709-724.
- Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys Acta* 2011; (1825): 29-36.

- Bellacosa A, Franke T F, Gonzalez-Portal M E, Datta K, Taguchi T, Gardner J, Cheng J Q, Testa J R, Tsichlis P N. Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications. *Oncogene* 1993; (8): 745-754.
- Ben Levy R, Paterson H F, Marshall C J, Yarden Y. A single autophosphorylation site confers oncogenicity to the Neu/ErbB-2 receptor and enables coupling to the MAP kinase pathway. *EMBO J* 1994; (13): 3302-3311.
- Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper J T, Dodge R, Clarke-Pearson D L, Marks P, . Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 1990; (50): 4087-4091.
- Berchuck A, Kohler M F, Marks J R, Wiseman R, Boyd J, Bast R C, Jr. The p53 tumor suppressor gene frequently is altered in gynecologic cancers. *Am J Obstet Gynecol* 1994; (170): 246-252.
- Beurel E, Joje R S. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol* 2006; (79): 173-189.
- Birkedal-Hansen H. From tadpole collagenase to a family of matrix metalloproteinases. *J Oral Pathol* 1988; (17): 445-451.
- Bjornsti M A, Houghton P J. Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer. *Cancer Cell* 2004; (5): 519-523.
- Blanks A M, Thornton S. The role of oxytocin in parturition. *BJOG* 2003; (110 Suppl 20): 46-51.
- Bokhman J V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 1983; (15): 10-17.
- Boland D, Goren H J. Binding and structural properties of oxytocin receptors in isolated rat epididymal adipocytes. *Regul Pept* 1987; (18): 7-18.
- Boland E, Clayton-Smith J, Woo V G, McKee S, Manson F D, Medne L, Zackai E, Swanson E A, Fitzpatrick D, Millen K J, Sherr E H, Dobyns W B, Black G C. Mapping of deletion and translocation breakpoints in 1q44 implicates the serine/threonine kinase AKT3 in postnatal microcephaly and agenesis of the corpus callosum. *Am J Hum Genet* 2007; (81): 292-303.

- Boldin M P, Varfolomeev E E, Pancer Z, Mett I L, Camonis J H, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 1995; (270): 7795-7798.
- Bononi A, Agnoletto C, De Marchi E, Marchi S, Patergnani S, Bonora M, Giorgi C, Missiroli S, Poletti F, Rimessi A, Pinton P. Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res* 2011; (2011): 329098.
- Bos J L. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res* 1988; (195): 255-271.
- Bos J L, Fearon E R, Hamilton S R, Verlaan-de Vries M, van Boom J H, van der Eb A J, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; (327): 293-297.
- Bos J L, Toksoz D, Marshall C J, Verlaan-de Vries M, Veeneman G H, van der Eb A J, van Boom J H, Janssen J W, Steenvoorden A C. Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukaemia. *Nature* 1985; (315): 726-730.
- Bozulic L, Hemmings B A. PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation. *Curr Opin Cell Biol* 2009; (21): 256-261.
- Bozulic L, Surucu B, Hynx D, Hemmings B A. PKB $\alpha$ /Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol Cell* 2008; (30): 203-213.
- Brancolini C, Lazarevic D, Rodriguez J, Schneider C. Dismantling cell-cell contacts during apoptosis is coupled to a caspase-dependent proteolytic cleavage of beta-catenin. *J Cell Biol* 1997; (139): 759-771.
- Brand A. Diagnostic du cancer de l'utérus chez les femmes ayant des saignements vaginaux anormaux. Dubuc-Lissoir J, Ehlen TG Plante M. 2000. Conseil de la SOGC.
- Brognard J, Sierrecki E, Gao T, Newton A C. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell* 2007; (25): 917-931.
- Brown D G, Sun X M, Cohen G M. Dexamethasone-induced apoptosis involves cleavage of DNA to large fragments prior to internucleosomal fragmentation. *J Biol Chem* 1993; (268): 3037-3039.

- Brunet A, Bonni A, Zigmond M J, Lin M Z, Juo P, Hu L S, Anderson M J, Arden K C, Blenis J, Greenberg M E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; (96): 857-868.
- Buchanan F G, Wang D, Bargiacchi F, Dubois R N. Prostaglandin E2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2003; (278): 35451-35457.
- Bunone G, Briand P A, Miksicek R J, Picard D. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 1996; (15): 2174-2183.
- Burden D A, Osheroff N. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1998; (1400): 139-154.
- Burgering B M, Medema R H. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* 2003; (73): 689-701.
- Byun D S, Cho K, Ryu B K, Lee M G, Kang M J, Kim H R, Chi S G. Hypermethylation of XIAP-associated factor 1, a putative tumor suppressor gene from the 17p13.2 locus, in human gastric adenocarcinomas. *Cancer Res* 2003; (63): 7068-7075.
- Calleja V, Alcor D, Laguerre M, Park J, Vojnovic B, Hemmings B A, Downward J, Parker P J, Larijani B. Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS Biol* 2007; (5): e95.
- Cardone M H, Roy N, Stennicke H R, Salvesen G S, Franke T F, Stanbridge E, Frisch S, Reed J C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; (282): 1318-1321.
- Carpten J D, Faber A L, Horn C, Donoho G P, Briggs S L, Robbins C M, Hostetter G, Boguslawski S, Moses T Y, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian Y W, Zeckner D J, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousses S, Bittner M, Schevitz R, Lai M H, Blanchard K L, Thomas J E. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 2007; (448): 439-444.
- Casciola-Rosen L, Nicholson D W, Chong T, Rowan K R, Thornberry N A, Miller D K, Rosen A. Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 1996; (183): 1957-1964.

- Cassoni P, Fulcheri E, Carcangiu M L, Stella A, Deaglio S, Bussolati G. Oxytocin receptors in human adenocarcinomas of the endometrium: presence and biological significance. *J Pathol* 2000; (190): 470-477.
- Cassoni P, Marrocco T, Bussolati B, Allia E, Munaron L, Sapino A, Bussolati G. Oxytocin induces proliferation and migration in immortalized human dermal microvascular endothelial cells and human breast tumor-derived endothelial cells. *Mol Cancer Res* 2006; (4): 351-359.
- Cassoni P, Marrocco T, Deaglio S, Sapino A, Bussolati G. Biological relevance of oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and primary tumors. *Ann Oncol* 2001a; (12 Suppl 2:S37-9.): S37-S39.
- Cassoni P, Sapino A, Fortunati N, Munaron L, Chini B, Bussolati G. Oxytocin inhibits the proliferation of MDA-MB231 human breast-cancer cells via cyclic adenosine monophosphate and protein kinase A. *Int J Cancer* 1997; (72): 340-344.
- Cassoni P, Sapino A, Marrocco T, Chini B, Bussolati G. Oxytocin and oxytocin receptors in cancer cells and proliferation. *J Neuroendocrinol* 2004; (16): 362-364.
- Cassoni P, Sapino A, Munaron L, Deaglio S, Chini B, Graziani A, Ahmed A, Bussolati G. Activation of functional oxytocin receptors stimulates cell proliferation in human trophoblast and choriocarcinoma cell lines. *Endocrinology* 2001b; (142): 1130-1136.
- Cassoni P, Sapino A, Negro F, Bussolati G. Oxytocin inhibits proliferation of human breast cancer cell lines. *Virchows Arch* 1994; (425): 467-472.
- Cassoni P, Sapino A, Stella A, Bussolati G. Antiproliferative effect of oxytocin through specific oxytocin receptors in human neuroblastoma and astrocytoma cell lines. *Adv Exp Med Biol* 1998a; (449): 245-246.
- Cassoni P, Sapino A, Stella A, Fortunati N, Bussolati G. Presence and significance of oxytocin receptors in human neuroblastomas and glial tumors. *Int J Cancer* 1998b; (77): 695-700.
- Cattaneo M G, Chini B, Vicentini L M. Oxytocin stimulates migration and invasion in human endothelial cells. *Br J Pharmacol* 2008; (153): 728-736.
- Cauwe B, Van den Steen P E, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007; (42): 113-185.

- Chagpar R B, Links P H, Pastor M C, Furber L A, Hawrysh A D, Chamberlain M D, Anderson D H. Direct positive regulation of PTEN by the p85 subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; (107): 5471-5476.
- Chandrasekharan N V, Dai H, Roos K L, Evanson N K, Tomsik J, Elton T S, Simmons D L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; (99): 13926-13931.
- Chandrasekher Y A, Fortune J E. Effects of oxytocin on steroidogenesis by bovine theca and granulosa cells. *Endocrinology* 1990; (127): 926-933.
- Chantry D, Vojtek A, Kashishian A, Holtzman D A, Wood C, Gray P W, Cooper J A, Hoekstra M F. p110delta, a novel phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit that associates with p85 and is expressed predominantly in leukocytes. *J Biol Chem* 1997; (272): 19236-19241.
- Chaudhry P, Asselin E. Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 2009; (16): 363-380.
- Chen W S, Xu P Z, Gottlob K, Chen M L, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* 2001; (15): 2203-2208.
- Cheng J Q, Godwin A K, Bellacosa A, Taguchi T, Franke T F, Hamilton T C, Tsichlis P N, Testa J R. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; (89): 9267-9271.
- Cheng J Q, Ruggeri B, Klein W M, Sonoda G, Altomare D A, Watson D K, Testa J R. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; (93): 3636-3641.
- Chibbar R, Miller F D, Mitchell B F. Synthesis of oxytocin in amnion, chorion, and decidua may influence the timing of human parturition. *J Clin Invest* 1993; (91): 185-192.
- Chin Y R, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal* 2009; (21): 470-476.



- Chinnaiyan A M, O'Rourke K, Tewari M, Dixit V M. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995; (81): 505-512.
- Cho H, Mu J, Kim J K, Thorvaldsen J L, Chu Q, Crenshaw E B, III, Kaestner K H, Bartolomei M S, Shulman G I, Birnbaum M J. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science* 2001a; (292): 1728-1731.
- Cho H, Thorvaldsen J L, Chu Q, Feng F, Birnbaum M J. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem* 2001b; (276): 38349-38352.
- Cho J Y, Kim J H, Lee Y H, Chung K Y, Kim S K, Gong S J, You N C, Chung H C, Roh J K, Kim B S. Correlation between K-ras gene mutation and prognosis of patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 1997; (79): 462-467.
- Choudhury A, Kiessling R. Her-2/neu as a paradigm of a tumor-specific target for therapy. *Breast Dis* 2004; (20:25-31.): 25-31.
- Chung C Y, Funamoto S, Firtel R A. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. *Trends Biochem Sci* 2001; (26): 557-566.
- Chung S K, Lee M G, Ryu B K, Lee J H, Han J, Byun D S, Chae K S, Lee K Y, Jang J Y, Kim H J, Chi S G. Frequent alteration of XAF1 in human colorectal cancers: implication for tumor cell resistance to apoptotic stresses. *Gastroenterology* 2007; (132): 2459-2477.
- Cianciulli A M, Guadagni F, Marzano R, Benevolo M, Merola R, Giannarelli D, Marandino F, Vocaturo G, Mariani L, Mottolese M. HER-2/neu oncogene amplification and chromosome 17 aneusomy in endometrial carcinoma: correlation with oncoprotein expression and conventional pathological parameters. *J Exp Clin Cancer Res* 2003; (22): 265-271.
- Clark A S, West K, Streicher S, Dennis P A. Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2002; (1): 707-717.
- Clark E A, Brugge J S. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; (268): 233-239.
- Coffer P J, Jin J, Woodgett J R. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* 1998; (335 ( Pt 1)): 1-13.

- Cohen G M, Sun X M, Fearnhead H, MacFarlane M, Brown D G, Snowden R T, Dinsdale D. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. *J Immunol* 1994; (153): 507-516.
- Coleman R A, Grix S P, Head S A, Louttit J B, Mallett A, Sheldrick R L. A novel inhibitory prostanoid receptor in piglet saphenous vein. *Prostaglandins* 1994a; (47): 151-168.
- Coleman R A, Smith W L, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 1994b; (46): 205-229.
- Conrad K P, Gellai M, North W G, Valtin H. Influence of oxytocin on renal hemodynamics and sodium excretion. *Ann N Y Acad Sci* 1993; (689): 346-362.
- Copland J A, Ives K L, Simmons D J, Soloff M S. Functional oxytocin receptors discovered in human osteoblasts. *Endocrinology* 1999a; (140): 4371-4374.
- Copland J A, Jeng Y J, Strakova Z, Ives K L, Hellmich M R, Soloff M S. Demonstration of functional oxytocin receptors in human breast Hs578T cells and their up-regulation through a protein kinase C-dependent pathway. *Endocrinology* 1999b; (140): 2258-2267.
- Coussens L, Yang-Feng T L, Liao Y C, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg P H, Libermann T A, Schlessinger J, Francke U, . Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985; (230): 1132-1139.
- Dai D L, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J Clin Oncol* 2005; (23): 1473-1482.
- Dai Z, Zhu W G, Morrison C D, Brena R M, Smiraglia D J, Raval A, Wu Y Z, Rush L J, Ross P, Molina J R, Otterson G A, Plass C. A comprehensive search for DNA amplification in lung cancer identifies inhibitors of apoptosis cIAP1 and cIAP2 as candidate oncogenes. *Hum Mol Genet* 2003; (12): 791-801.
- Dan H C, Sun M, Kaneko S, Feldman R I, Nicosia S V, Wang H G, Tsang B K, Cheng J Q. Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *J Biol Chem* 2004; (279): 5405-5412.

- Daniel T O, Liu H, Morrow J D, Crews B C, Marnett L J. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res* 1999; (59): 4574-4577.
- Das S, Dixon J E, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; (100): 7491-7496.
- Datta K, Franke T F, Chan T O, Makris A, Yang S I, Kaplan D R, Morrison D K, Golemis E A, Tsichlis P N. AH/PH domain-mediated interaction between Akt molecules and its potential role in Akt regulation. *Mol Cell Biol* 1995; (15): 2304-2310.
- Datta S R, Brunet A, Greenberg M E. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 1999; (13): 2905-2927.
- Datta S R, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik S W, Yaffe M B, Greenberg M E. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 2000; (6): 41-51.
- Datta S R, Ranger A M, Lin M Z, Sturgill J F, Ma Y C, Cowan C W, Dikkes P, Korsmeyer S J, Greenberg M E. Survival factor-mediated BAD phosphorylation raises the mitochondrial threshold for apoptosis. *Dev Cell* 2002; (3): 631-643.
- Davies M A, Lu Y, Sano T, Fang X, Tang P, LaPushin R, Koul D, Bookstein R, Stokoe D, Yung W K, Mills G B, Steck P A. Adenoviral transgene expression of MMAC/PTEN in human glioma cells inhibits Akt activation and induces anoikis. *Cancer Res* 1998; (58): 5285-5290.
- DAWE C J, BANFIELD W G, MORGAN W D, SLATICK M S, CURTH H O. Growth in continous culture, and in hamsters, of cells from a neoplasm associated with acanthosis nigricans. *J Natl Cancer Inst* 1964; (33:441-56.): 441-456.
- Debatin K M, Krammer P H. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 2004; (23): 2950-2966.
- Dedes K J, Wetterskog D, Mendes-Pereira A M, Natrajan R, Lambros M B, Geyer F C, Vatcheva R, Savage K, Mackay A, Lord C J, Ashworth A, Reis-Filho J S. PTEN Deficiency in Endometrioid Endometrial Adenocarcinomas Predicts Sensitivity to PARP Inhibitors. *Sci Transl Med* 2010; (2): 53ra75.
- Delcommenne M, Tan C, Gray V, Rue L, Woodgett J, Dedhar S. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; (95): 11211-11216.

- Deligdisch L, Holinka C F. Endometrial carcinoma: two diseases? *Cancer Detect Prev* 1987; (10): 237-246.
- DeLong P, Tanaka T, Krukltis R, Henry A C, Kapoor V, Kaiser L R, Sterman D H, Albelda S M. Use of cyclooxygenase-2 inhibition to enhance the efficacy of immunotherapy. *Cancer Res* 2003; (63): 7845-7852.
- Deng X, Ruvolo P, Carr B, May W S, Jr. Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; (97): 1578-1583.
- Denning G, Jean-Joseph B, Prince C, Durden D L, Vogt P K. A short N-terminal sequence of PTEN controls cytoplasmic localization and is required for suppression of cell growth. *Oncogene* 2007; (26): 3930-3940.
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou J C. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 1999; (144): 891-901.
- Deveraux Q L, Leo E, Stennicke H R, Welsh K, Salvesen G S, Reed J C. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 1999; (18): 5242-5251.
- Deveraux Q L, Roy N, Stennicke H R, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula S M, Alnemri E S, Salvesen G S, Reed J C. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998; (17): 2215-2223.
- Deveraux Q L, Takahashi R, Salvesen G S, Reed J C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997; (388): 300-304.
- Diehl J A, Cheng M, Roussel M F, Sherr C J. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 1998; (12): 3499-3511.
- Dijkers P F, Birkenkamp K U, Lam E W, Thomas N S, Lammers J W, Koenderman L, Coffey P J. FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J Cell Biol* 2002; (156): 531-542.

- Dilling M B, Germain G S, Dudkin L, Jayaraman A L, Zhang X, Harwood F C, Houghton P J. 4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are down-regulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin. *J Biol Chem* 2002; (277): 13907-13917.
- Dillon R L, Muller W J. Distinct biological roles for the akt family in mammary tumor progression. *Cancer Res* 2010; (70): 4260-4264.
- Dohadwala M, Batra R K, Luo J, Lin Y, Krysan K, Pold M, Sharma S, Dubinett S M. Autocrine/paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent invasion. *J Biol Chem* 2002; (277): 50828-50833.
- Domin J, Pages F, Volinia S, Rittenhouse S E, Zvelebil M J, Stein R C, Waterfield M D. Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem J* 1997; (326 ( Pt 1)): 139-147.
- Downward J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol* 2004; (15): 177-182.
- Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000; (102): 33-42.
- DU V, V, RESSLER C, TRIPPETT S. The sequence of amino acids in oxytocin, with a proposal for the structure of oxytocin. *J Biol Chem* 1953; (205): 949-957.
- Dubois R N, Abramson S B, Crofford L, Gupta R A, Simon L S, Van De Putte L B, Lipsky P E. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998; (12): 1063-1073.
- Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle* 2008; (7): 1036-1046.
- Eckelman B P, Salvesen G S. The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. *J Biol Chem* 2006; (281): 3254-3260.
- Eckelman B P, Salvesen G S, Scott F L. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep* 2006; (7): 988-994.
- Einspanier A, Ivell R, Hodges J K. Oxytocin: a follicular luteinisation factor in the marmoset monkey. *Adv Exp Med Biol* 1995; (395): 517-522.

- Einspanier A, Jurdzinski A, Hodges J K. A local oxytocin system is part of the luteinization process in the preovulatory follicle of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Biol Reprod* 1997; (57): 16-26.
- Ellis R E, Jacobson D M, Horvitz H R. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1991; (129): 79-94.
- Emonard H, Grimaud J A. Matrix metalloproteinases. A review. *Cell Mol Biol* 1990; (36): 131-153.
- Enomoto T, Fujita M, Inoue M, Nomura T, Shroyer K R. Alteration of the p53 tumor suppressor gene and activation of c-K-ras-2 protooncogene in endometrial adenocarcinoma from Colorado. *Am J Clin Pathol* 1995; (103): 224-230.
- Enomoto T, Fujita M, Inoue M, Rice J M, Nakajima R, Tanizawa O, Nomura T. Alterations of the p53 tumor suppressor gene and its association with activation of the c-K-ras-2 protooncogene in premalignant and malignant lesions of the human uterine endometrium. *Cancer Res* 1993; (53): 1883-1888.
- Enomoto T, Inoue M, Perantoni A O, Buzard G S, Miki H, Tanizawa O, Rice J M. K-ras activation in premalignant and malignant epithelial lesions of the human uterus. *Cancer Res* 1991; (51): 5308-5314.
- Ermoian R P, Furniss C S, Lamborn K R, Basila D, Berger M S, Gottschalk A R, Nicholas M K, Stokoe D, Haas-Kogan D A. Dysregulation of PTEN and protein kinase B is associated with glioma histology and patient survival. *Clin Cancer Res* 2002; (8): 1100-1106.
- Esteller M, Xercavins J, Reventos J. Advances in the molecular genetics of endometrial cancer (Review). *Oncol Rep* 1999; (6): 1377-1382.
- Fadok V A, Voelker D R, Campbell P A, Cohen J J, Bratton D L, Henson P M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; (148): 2207-2216.
- Fang J, Shing Y, Wiederschain D, Yan L, Butterfield C, Jackson G, Harper J, Tamvakopoulos G, Moses M A. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; (97): 3884-3889.

- Fanning A S, Anderson J M. Protein modules as organizers of membrane structure. *Curr Opin Cell Biol* 1999; (11): 432-439.
- Farahani R, Fong W G, Korneluk R G, MacKenzie A E. Genomic organization and primary characterization of miap-3: the murine homologue of human X-linked IAP. *Genomics* 1997; (42): 514-518.
- Favaretto A L, Ballejo G O, Albuquerque-Araujo W I, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J, McCann S M. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides* 1997; (18): 1377-1381.
- Fedi P, Pierce J H, di Fiore P P, Kraus M H. Efficient coupling with phosphatidylinositol 3-kinase, but not phospholipase C gamma or GTPase-activating protein, distinguishes ErbB-3 signaling from that of other ErbB/EGFR family members. *Mol Cell Biol* 1994; (14): 492-500.
- Fenton T R, Gout I T. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; (43): 47-59.
- Ferguson S E, Olshen A B, Viale A, Awtrey C S, Barakat R R, Boyd J. Gene expression profiling of tamoxifen-associated uterine cancers: evidence for two molecular classes of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004; (92): 719-725.
- Fidler I J, Hart I R. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 1982; (217): 998-1003.
- Flint A P, Lamming G E, Stewart H J, Abayasekara D R. The role of the endometrial oxytocin receptor in determining the length of the sterile oestrous cycle and ensuring maintenance of luteal function in early pregnancy in ruminants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994; (344): 291-304.
- Fong W G, Liston P, Rajcan-Separovic E, St Jean M, Craig C, Korneluk R G. Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics* 2000; (70): 113-122.
- Forsyth P A, Wong H, Laing T D, Rewcastle N B, Morris D G, Muzik H, Leco K J, Johnston R N, Brasher P M, Sutherland G, Edwards D R. Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas. *Br J Cancer* 1999; (79): 1828-1835.

- Foukas L C, Claret M, Pearce W, Okkenhaug K, Meek S, Peskett E, Sancho S, Smith A J, Withers D J, Vanhaesebroeck B. Critical role for the p110 $\alpha$  phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature* 2006; (441): 366-370.
- Frayne J, Nicholson H D. Localization of oxytocin receptors in the human and macaque monkey male reproductive tracts: evidence for a physiological role of oxytocin in the male. *Mol Hum Reprod* 1998; (4): 527-532.
- Frias M A, Thoreen C C, Jaffe J D, Schroder W, Sculley T, Carr S A, Sabatini D M. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 2006; (16): 1865-1870.
- Fuchs A R, Fuchs F, Soloff M S. Oxytocin receptors in nonpregnant human uterus. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; (60): 37-41.
- Fujimoto J, Ichigo S, Hirose R, Sakaguchi H, Tamaya T. Clinical implication of expression of progesterone receptor form A and B mRNAs in secondary spreading of gynecologic cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; (62): 449-454.
- Fulda S, Debatin K M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006; (25): 4798-4811.
- Furnari F B, Huang H J, Cavenee W K. The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum-sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res* 1998; (58): 5002-5008.
- Futreal P A, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton M R. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2004; (4): 177-183.
- Gagnon V, Mathieu I, Sexton E, Leblanc K, Asselin E. AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol Oncol* 2004; (94): 785-795.
- Gagnon V, St Germain M E, Parent S, Asselin E. Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1. *Int J Oncol* 2003; (23): 803-810.
- Gagnon V, Van Themsche C, Turner S, Leblanc V, Asselin E. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* 2008; (13): 259-271.
- Gajewski T F, Thompson C B. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell* 1996; (87): 589-592.



- Galban S, Duckett C S. XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death Differ* 2010; (17): 54-60.
- Gao J, Mazella J, Tang M, Tseng L. Ligand-activated progesterone receptor isoform hPR-A is a stronger transactivator than hPR-B for the expression of IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein-1) in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol* 2000; (14): 1954-1961.
- Garcia-Calvo M, Peterson E P, Rasper D M, Vaillancourt J P, Zamboni R, Nicholson D W, Thornberry N A. Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ* 1999; (6): 362-369.
- Garofalo R S, Orena S J, Rafidi K, Torchia A J, Stock J L, Hildebrandt A L, Coskran T, Black S C, Brees D J, Wicks J R, McNeish J D, Coleman K G. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 2003; (112): 197-208.
- Geenen V, Legros J J, Franchimont P, Baudrihay M, Defresne M P, Boniver J. The neuroendocrine thymus: coexistence of oxytocin and neurophysin in the human thymus. *Science* 1986; (232): 508-511.
- Georgescu M M. PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes Cancer* 2010; (1): 1170-1177.
- Georgescu M M, Kirsch K H, Akagi T, Shishido T, Hanafusa H. The tumor-suppressor activity of PTEN is regulated by its carboxyl-terminal region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; (96): 10182-10187.
- Georgescu M M, Kirsch K H, Kaloudis P, Yang H, Pavletich N P, Hanafusa H. Stabilization and productive positioning roles of the C2 domain of PTEN tumor suppressor. *Cancer Res* 2000; (60): 7033-7038.
- Geske F J, Gerschenson L E. The biology of apoptosis. *Hum Pathol* 2001; (32): 1029-1038.
- Girouard J, Lafleur MJ, Parent S, Leblanc V, Asselin E. Involvement of Akt isoforms in chemoresistance of endometrial carcinoma cells. *Gynecol. Oncol.* 2013 Feb;128(2):335-43
- Ghobrial I M, Witzig T E, Adjei A A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005; (55): 178-194.

- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson W G, Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 1997; (277): 225-228.
- Gilles C, Polette M, Coraux C, Tournier J M, Meneguzzi G, Munaut C, Volders L, Rousselle P, Birembaut P, Foidart J M. Contribution of MT1-MMP and of human laminin-5 gamma2 chain degradation to mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci* 2001; (114): 2967-2976.
- Gimpl G, Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* 2001; (81): 629-683.
- Graesslin O, Cortez A, Uzan C, Birembaut P, Quereux C, Darai E. Endometrial tumor invasiveness is related to metalloproteinase 2 and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 expressions. *Int J Gynecol Cancer* 2006; (16): 1911-1917.
- Graus-Porta D, Beerli R R, Daly J M, Hynes N E. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997; (16): 1647-1655.
- Green D R. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998; (94): 695-698.
- Greene E R, Huang S, Serhan C N, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011; (96): 27-36.
- Griffiths G J, Dubrez L, Morgan C P, Jones N A, Whitehouse J, Corfe B M, Dive C, Hickman J A. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 1999; (144): 903-914.
- Grille S J, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto A J, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tschlis P N, Larue L. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 2003; (63): 2172-2178.
- Gross J, Lapiere C M. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1962; (48): 1014-1022.
- Guertin D A, Stevens D M, Thoreen C C, Burds A A, Kalaany N Y, Moffat J, Brown M, Fitzgerald K J, Sabatini D M. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 2006; (11): 859-871.

- Guo X, Goessl E, Jin G, Collie-Duguid E S, Cassidy J, Wang W, O'Brien V. Cell cycle perturbation and acquired 5-fluorouracil chemoresistance. *Anticancer Res* 2008; (28): 9-14.
- Guzzi F, Zanchetta D, Cassoni P, Guzzi V, Francolini M, Parenti M, Chini B. Localization of the human oxytocin receptor in caveolin-1 enriched domains turns the receptor-mediated inhibition of cell growth into a proliferative response. *Oncogene* 2002; (21): 1658-1667.
- Gyrd-Hansen M, Meier P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF-kappaB, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; (10): 561-574.
- Hanada M, Feng J, Hemmings B A. Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* 2004; (1697): 3-16.
- Harizi H, Corcuff J B, Gualde N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* 2008; (14): 461-469.
- Harris R C, Breyer M D. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; (281): F1-11.
- Harris S G, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps R P. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol* 2002; (23): 144-150.
- Hatakeyama S, Yamamoto H, Ohyama C. Tumor formation assays. *Methods Enzymol* 2010; (479): 397-411.
- Hauser H P, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol* 1998; (141): 1415-1422.
- Hawkins P T, Jackson T R, Stephens L R. Platelet-derived growth factor stimulates synthesis of PtdIns(3,4,5)P3 by activating a PtdIns(4,5)P2 3-OH kinase. *Nature* 1992; (358): 157-159.
- Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Kanzaki T, Murata Y. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res* 2000; (60): 5988-5994.
- Hecht J L, Mutter G L. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. *J Clin Oncol* 2006; (24): 4783-4791.

- Hegde R, Srinivasula S M, Datta P, Madesh M, Wassell R, Zhang Z, Cheong N, Nejme J, Fernandes-Alnemri T, Hoshino S, Alnemri E S. The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J Biol Chem* 2003; (278): 38699-38706.
- Hegde R, Srinivasula S M, Zhang Z, Wassell R, Mukattash R, Cilenti L, DuBois G, Lazebnik Y, Zervos A S, Fernandes-Alnemri T, Alnemri E S. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 2002; (277): 432-438.
- Hers I, Vincent E E, Tavaré J M. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 2011; (23): 1515-1527.
- Herschman H R. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996; (1299): 125-140.
- Hetzel D J, Wilson T O, Keeney G L, Roche P C, Cha S S, Podratz K C. HER-2/neu expression: a major prognostic factor in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1992; (47): 179-185.
- Hoeflich K P, Luo J, Rubie E A, Tsao M S, Jin O, Woodgett J R. Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF- $\kappa$ B activation. *Nature* 2000; (406): 86-90.
- Hotary K, Li X Y, Allen E, Stevens S L, Weiss S J. A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program. *Genes Dev* 2006; (20): 2673-2686.
- Hresko R C, Mueckler M. mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2005; (280): 40406-40416.
- Huang L H, Hu J Q, Tao W Q, Li Y H, Li G M, Xie P Y, Liu X S, Jiang J. Gossypol inhibits phosphorylation of Bcl-2 in human leukemia HL-60 cells. *Eur J Pharmacol* 2010; (645): 9-13.
- Hussain S P, Harris C C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; (121): 2373-2380.
- Hwang D, Scollard D, Byrne J, Levine E. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1998; (90): 455-460.
- Imoto I, Yang Z Q, Pimkhaokham A, Tsuda H, Shimada Y, Imamura M, Ohki M, Inazawa J. Identification of cIAP1 as a candidate target gene within an amplicon at

11q22 in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 2001; (61): 6629-6634.

- Inukai K, Funaki M, Ogiwara T, Katagiri H, Kanda A, Anai M, Fukushima Y, Hosaka T, Suzuki M, Shin B C, Takata K, Yazaki Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T. p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin. *J Biol Chem* 1997; (272): 7873-7882.
- Itano Y, Ito A, Uehara T, Nomura Y. Regulation of Bcl-2 protein expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: positive and negative effects of protein kinases C and A, respectively. *J Neurochem* 1996; (67): 131-137.
- Ito K, Watanabe K, Nasim S, Sasano H, Sato S, Yajima A, Silverberg S G, Garrett C T. K-ras point mutations in endometrial carcinoma: effect on outcome is dependent on age of patient. *Gynecol Oncol* 1996; (63): 238-246.
- Ivell R, Balvers M, Rust W, Bathgate R, Einspanier A. Oxytocin and male reproductive function. *Adv Exp Med Biol* 1997; (424): 253-264.
- Ivell R, Richter D. Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; (81): 2006-2010.
- Jabbour H N, Sales K J. Prostaglandin receptor signalling and function in human endometrial pathology. *Trends Endocrinol Metab* 2004; (15): 398-404.
- Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung S Y, Huang Q, Qin J, Su B. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 2006; (127): 125-137.
- Jacobson M D. Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected. *Curr Biol* 1997; (7): R277-R281.
- James S R, Downes C P, Gigg R, Grove S J, Holmes A B, Alessi D R. Specific binding of the Akt-1 protein kinase to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate without subsequent activation. *Biochem J* 1996; (315 ( Pt 3)): 709-713.
- Jankowski M, Hajjar F, Kawas S A, Mukaddam-Daher S, Hoffman G, McCann S M, Gutkowska J. Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; (95): 14558-14563.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; (60): 277-300.
- Jia S, Roberts T M, Zhao J J. Should individual PI3 kinase isoforms be targeted in cancer? *Curr Opin Cell Biol* 2009; (21): 199-208.

- Jimenez R E, Hussain M, Bianco F J, Jr., Vaishampayan U, Tabazcka P, Sakr W A, Pontes J E, Wood D P, Jr., Grignon D J. Her-2/neu overexpression in muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: prognostic significance and comparative analysis in primary and metastatic tumors. *Clin Cancer Res* 2001; (7): 2440-2447.
- Jin H S, Lee D H, Kim D H, Chung J H, Lee S J, Lee T H. cIAP1, cIAP2, and XIAP act cooperatively via nonredundant pathways to regulate genotoxic stress-induced nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Res* 2009; (69): 1782-1791.
- Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Sato S, Akeshima R, Terakawa N. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; (7): 892-895.
- Kang Y J, Mbonye U R, DeLong C J, Wada M, Smith W L. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Prog Lipid Res* 2007; (46): 108-125.
- Kasas S. Embryologie et histologie de l'appareil génital. Département de Biologie Cellulaire et de Morphologie. 2008. Université de Lausanne.
- Kashyap T, Rabinovitz I. The calcium-calcineurin pathway promotes hemidesmosome stability through inhibition of beta4 integrin phosphorylation. *J Biol Chem* 2012.
- Kasof G M, Gomes B C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 2001; (276): 3238-3246.
- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995; (270): 1491-1494.
- Kaufmann W E, Andreasson K I, Isakson P C, Worley P F. Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins* 1997; (54): 601-624.
- Keely P J. Mechanisms by Which the Extracellular Matrix and Integrin Signaling Act to Regulate the Switch Between Tumor Suppression and Tumor Promotion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2011.
- Keightley M C, Sales K J, Jabbour H N. PGF2alpha-F-prostanoid receptor signalling via ADAMTS1 modulates epithelial cell invasion and endothelial cell function in endometrial cancer. *BMC Cancer* 2010; (10): 488.

- Kendrick K M. Oxytocin, motherhood and bonding. *Exp Physiol* 2000; (85 Spec No): 111S-124S.
- Keniry M, Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene* 2008; (27): 5477-5485.
- Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; (26): 239-257.
- Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; (141): 52-67.
- Khan-Dawood F S. Oxytocin in intercellular communication in the corpus luteum. *Semin Reprod Endocrinol* 1997; (15): 395-407.
- Khanna C, Hunter K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* 2005; (26): 513-523.
- Kim D, Kim S, Koh H, Yoon S O, Chung A S, Cho K S, Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J* 2001; (15): 1953-1962.
- Kimura T. Regulation of the human oxytocin receptor in the uterus: a molecular approach. *Hum Reprod Update* 1998; (4): 615-624.
- King C R, Kraus M H, Aaronson S A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985; (229): 974-976.
- Kirschenbaum A, Klausner A P, Lee R, Unger P, Yao S, Liu X H, Levine A C. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate. *Urology* 2000; (56): 671-676.
- Kischkel F C, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer P H, Peter M E. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; (14): 5579-5588.
- Kiss A, Mikkelsen J D. Oxytocin--anatomy and functional assignments: a minireview. *Endocr Regul* 2005; (39): 97-105.
- Klein G, Vellenga E, Fraaije M W, Kamps W A, de Bont E S. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; (50): 87-100.



- Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2011; (41): 271-290.
- Knuefermann C, Lu Y, Liu B, Jin W, Liang K, Wu L, Schmidt M, Mills G B, Mendelsohn J, Fan Z. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene* 2003; (22): 3205-3212.
- Kohn E C, Liotta L A. Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention. *Cancer Res* 1995; (55): 1856-1862.
- Kohn E. Invasion and Metastases. In: *Cancer Medicine*. (Ed.BC Decker Inc). 2006; 7e: 148-156.
- Kojima M, Morisaki T, Uchiyama A, Doi F, Mibu R, Katano M, Tanaka M. Association of enhanced cyclooxygenase-2 expression with possible local immunosuppression in human colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol* 2001; (8): 458-465.
- Kolla S B, Seth A, Singh M K, Gupta N P, Hemal A K, Dogra P N, Kumar R. Prognostic significance of Her2/neu overexpression in patients with muscle invasive urinary bladder cancer treated with radical cystectomy. *Int Urol Nephrol* 2008; (40): 321-327.
- Konishi H, Kuroda S, Tanaka M, Matsuzaki H, Ono Y, Kameyama K, Haga T, Kikkawa U. Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; (216): 526-534.
- Koshikawa N, Giannelli G, Cirulli V, Miyazaki K, Quaranta V. Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5. *J Cell Biol* 2000; (148): 615-624.
- Kramer R M, Roberts E F, Um S L, Borsch-Haubold A G, Watson S P, Fisher M J, Jakubowski J A. p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA2. *J Biol Chem* 1996; (271): 27723-27729.
- Kreisberg J I, Malik S N, Prihoda T J, Bedolla R G, Troyer D A, Kreisberg S, Ghosh P M. Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. *Cancer Res* 2004; (64): 5232-5236.

- Krishnaswamy N, Lacroix-Pepin N, Chapdelaine P, Taniguchi H, Kauffenstein G, Chakravarti A, Danyod G, Fortier M A. Epidermal growth factor receptor is an obligatory intermediate for oxytocin-induced cyclooxygenase 2 expression and prostaglandin F2 alpha production in bovine endometrial epithelial cells. *Endocrinology* 2010; (151): 1367-1374.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin S A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997; (18): 44-51.
- Kroner C, Eybrechts K, Akkerman J W. Dual regulation of platelet protein kinase B. *J Biol Chem* 2000; (275): 27790-27798.
- Ku B, Liang C, Jung J U, Oh B H. Evidence that inhibition of BAX activation by BCL-2 involves its tight and preferential interaction with the BH3 domain of BAX. *Cell Res* 2010.
- Ku C Y, Qian A, Wen Y, Anwer K, Sanborn B M. Oxytocin stimulates myometrial guanosine triphosphatase and phospholipase-C activities via coupling to G alpha q/11. *Endocrinology* 1995; (136): 1509-1515.
- Kumar C C, Madison V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* 2005; (24): 7493-7501.
- Kumar S. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2007; (14): 32-43.
- Kuramoto H, Tamura S, Notake Y. Establishment of a cell line of human endometrial adenocarcinoma in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1972; (114): 1012-1019.
- Kurman R J, Kaminski P F, Norris H J. The behavior of endometrial hyperplasia. A long-term study of "untreated" hyperplasia in 170 patients. *Cancer* 1985; (56): 403-412.
- Larkins T L, Nowell M, Singh S, Sanford G L. Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. *BMC Cancer* 2006; (6): 181.
- Larousse. Dictionnaire Larousse Médical. Paris 1998.
- Lau M T, Wong A S, Leung P C. Gonadotropins induce tumor cell migration and invasion by increasing cyclooxygenases expression and prostaglandin E(2) production in human ovarian cancer cells. *Endocrinology* 2010; (151): 2985-2993.

- Lavrik I N, Golks A, Krammer P H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005; (115): 2665-2672.
- Lazar E, Tudose N, Lazar D C. Prognostic significance of c-erbB2 protein in endometrial cancer. *Rom J Morphol Embryol* 1998; (44): 101-107.
- Leber M F, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *Int J Oncol* 2009; (34): 881-895.
- Lee E J, Choi E M, Kim S R, Park J H, Kim H, Ha K S, Kim Y M, Kim S S, Choe M, Kim J I, Han J A. Cyclooxygenase-2 promotes cell proliferation, migration and invasion in U2OS human osteosarcoma cells. *Exp Mol Med* 2007; (39): 469-476.
- Lee E J, Kim T J, Kim D S, Choi C H, Lee J W, Lee J H, Bae D S, Kim B G. p53 alteration independently predicts poor outcomes in patients with endometrial cancer: a clinicopathologic study of 131 cases and literature review. *Gynecol Oncol* 2010; (116): 533-538.
- Lee J H, Lee S K, Yang M H, Ahmed M M, Mohiuddin M, Lee E Y. Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1996; (62): 49-54.
- Lee J O, Yang H, Georgescu M M, Di Cristofano A, Maehama T, Shi Y, Dixon J E, Pandolfi P, Pavletich N P. Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell* 1999; (99): 323-334.
- Lee S, Choi E J, Jin C, Kim D H. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line. *Gynecol Oncol* 2005; (97): 26-34.
- Lee S R, Yang K S, Kwon J, Lee C, Jeong W, Rhee S G. Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 2002; (277): 20336-20342.
- Lefebvre D L, Giaid A, Bennett H, Lariviere R, Zingg H H. Oxytocin gene expression in rat uterus. *Science* 1992a; (256): 1553-1555.
- Lefebvre D L, Giaid A, Zingg H H. Expression of the oxytocin gene in rat placenta. *Endocrinology* 1992b; (130): 1185-1192.
- Leslie N R, Biondi R M, Alessi D R. Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases. *Chem Rev* 2001; (101): 2365-2380.

- Lewin S N. Revised FIGO staging system for endometrial cancer. *Clin Obstet Gynecol* 2011; (54): 215-218.
- Li D M, Sun H. TEPI, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res* 1997; (57): 2124-2129.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang S I, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner S H, Giovanella B C, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler M H, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997a; (275): 1943-1947.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula S M, Ahmad M, Alnemri E S, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997b; (91): 479-489.
- Li Q, Subbulakshmi V, Oldfield C M, Aamir R, Weyman C M, Wolfman A, Cathcart M K. PKC $\alpha$  regulates phosphorylation and enzymatic activity of cPLA2 in vitro and in activated human monocytes. *Cell Signal* 2007; (19): 359-366.
- Lin L L, Wartmann M, Lin A Y, Knopf J L, Seth A, Davis R J. cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 1993; (72): 269-278.
- Lincoln S, Blessing J A, Lee R B, Rocereto T F. Activity of paclitaxel as second-line chemotherapy in endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2003; (88): 277-281.
- Liotta L A, Kohn E C. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; (411): 375-379.
- Liotta L A, Stetler-Stevenson W G. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 1991; (51): 5054s-5059s.
- Liston P, Fong W G, Kelly N L, Toji S, Miyazaki T, Conte D, Tamai K, Craig C G, McBurney M W, Korneluk R G. Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nat Cell Biol* 2001; (3): 128-133.
- Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda J E, MacKenzie A, Korneluk R G. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996; (379): 349-353.

- Liu C H, Chang S H, Narko K, Trifan O C, Wu M T, Smith E, Haudenschild C, Lane T F, Hla T. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001; (276): 18563-18569.
- Liu X, Kim C N, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; (86): 147-157.
- Liu X H, Kirschenbaum A, Lu M, Yao S, Dosoretz A, Holland J F, Levine A C. Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem* 2002; (277): 50081-50086.
- Liu Y, Bankaitis V A. Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease. *Prog Lipid Res* 2010; (49): 201-217.
- Lu M, Lin S C, Huang Y, Kang Y J, Rich R, Lo Y C, Myszkowski D, Han J, Wu H. XIAP induces NF- $\kappa$ B activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. *Mol Cell* 2007; (26): 689-702.
- Ma T L, Ni P H, Zhong J, Tan J H, Qiao M M, Jiang S H. Low expression of XIAP-associated factor 1 in human colorectal cancers. *Chin J Dig Dis* 2005; (6): 10-14.
- Maatta M, Talvensaari-Mattila A, Turpeenniemi-Hujanen T, Santala M. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) and their tissue inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in differential diagnosis between low malignant potential (LMP) and malignant ovarian tumours. *Anticancer Res* 2007; (27): 2753-2758.
- Macara I G, Marinetti G V, Balduzzi P C. Transforming protein of avian sarcoma virus UR2 is associated with phosphatidylinositol kinase activity: possible role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; (81): 2728-2732.
- MacDougall L K, Domin J, Waterfield M D. A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction. *Curr Biol* 1995; (5): 1404-1415.
- Mace P D, Shirley S, Day C L. Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death Differ* 2010; (17): 46-53.
- Maehama T, Dixon J E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 1998; (273): 13375-13378.

- Maehama T, Taylor G S, Dixon J E. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem* 2001; (70): 247-279.
- Mannhold R, Fulda S, Carosati E. IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy. *Drug Discov Today* 2010; (15): 210-219.
- Manning B D, Cantley L C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007; (129): 1261-1274.
- Mariani A, Sebo T J, Katzmman J A, Riehle D L, Dowdy S C, Keeney G L, Lesnick T G, Podratz K C. HER-2/neu overexpression and hormone dependency in endometrial cancer: analysis of cohort and review of literature. *Anticancer Res* 2005; (25): 2921-2927.
- Marieb E N. Le système génital. In: *Anatomie et physiologie humaines*. (Ed.Éditions du Renouveau Pédagogique Inc). The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 1999a; 2nd Edition: 1039-1085.
- Marieb E. La cellule: unité fondamentale de la vie. In: *Anatomie & Physiologie humaines*. (Ed.ERPI). 1999b; 2e: 62-107.
- Martin S J, Green D R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* 1995; (82): 349-352.
- Martin S J, Reutelingsperger C P, McGahon A J, Rader J A, van Schie R C, LaFace D M, Green D R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995; (182): 1545-1556.
- Martin-Belmonte F, Gassama A, Datta A, Yu W, Rescher U, Gerke V, Mostov K. PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* 2007; (128): 383-397.
- Martins L M, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty N F, Lemoine N R, Savopoulos J, Gray C W, Creasy C L, Dingwall C, Downward J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* 2002; (277): 439-444.
- Massova I, Kotra L P, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J* 1998; (12): 1075-1095.

- Maurer U, Charvet C, Wagman A S, Dejardin E, Green D R. Glycogen synthase kinase-3 regulates mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis by destabilization of MCL-1. *Mol Cell* 2006; (21): 749-760.
- Mayo L D, Donner D B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; (98): 11598-11603.
- McGrath J P, Capon D J, Smith D H, Chen E Y, Seeburg P H, Goeddel D V, Levinson A D. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 1983; (304): 501-506.
- Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer* 2006; (6): 449-458.
- Mehrotra S, Languino L R, Raskett C M, Mercurio A M, Dohi T, Altieri D C. IAP regulation of metastasis. *Cancer Cell* 2010; (17): 53-64.
- Meijer L. The cell division cycle and its regulation. *Oncologie* 2003; (5): 311-326.
- Mignon C, Okada A, Mattei M G, Basset P. Assignment of the human membrane-type matrix metalloproteinase (MMP14) gene to 14q11-q12 by in situ hybridization. *Genomics* 1995; (28): 360-361.
- Miller RT. Immunohistochemistry in the diagnosis of metastatic carcinoma of unknown primary origin. Annual Meeting of American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology . 2011.
- Mittal K, Soslow R, McCluggage W G. Application of immunohistochemistry to gynecologic pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2008; (132): 402-423.
- Molnar M, Rigo J, Jr., Romero R, Hertelendy F. Oxytocin activates mitogen-activated protein kinase and up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin production in human myometrial cells. *Am J Obstet Gynecol* 1999; (181): 42-49.
- Moore J J, Dubyak G R, Moore R M, Vander K D. Oxytocin activates the inositol-phospholipid-protein kinase-C system and stimulates prostaglandin production in human amnion cells. *Endocrinology* 1988a; (123): 1771-1777.
- Moore J J, Dubyak G R, Moore R M, Vander K D. Oxytocin activates the inositol-phospholipid-protein kinase-C system and stimulates prostaglandin production in human amnion cells. *Endocrinology* 1988b; (123): 1771-1777.

- Morita T, Shibata K, Kikkawa F, Kajiyama H, Ino K, Mizutani S. Oxytocin inhibits the progression of human ovarian carcinoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2004; (109): 525-532.
- Mundt A, Roeske J, Chung T, Weichselbaum R. Radiation Oncology. In: *Cancer Medicine*. (Ed. BC Decker Inc). 2006; 517-536.
- Murnane M J, Cai J, Shuja S, McAneny D, Klepeis V, Willett J B. Active MMP-2 effectively identifies the presence of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2009; (125): 2893-2902.
- Murohara T, Horowitz J R, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner J M. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 1998; (97): 99-107.
- Murphy G, Houbrechts A, Cockett M I, Williamson R A, O'Shea M, Docherty A J. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 1991; (30): 8097-8102.
- Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 2008; (29): 290-308.
- Murthy S S, Tosolini A, Taguchi T, Testa J R. Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 2000; (88): 38-40.
- Muslin A J, Tanner J W, Allen P M, Shaw A S. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 1996; (84): 889-897.
- Myers M P, Pass I, Batty I H, Van der K J, Stolarov J P, Hemmings B A, Wigler M H, Downes C P, Tonks N K. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; (95): 13513-13518.
- Myers M P, Stolarov J P, Eng C, Li J, Wang S I, Wigler M H, Parsons R, Tonks N K. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; (94): 9052-9057.
- Nagase H, Enghild J J, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry* 1990; (29): 5783-5789.



- Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006; (69): 562-573.
- Nakatani K, Thompson D A, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel R J, Roth R A. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem* 1999; (274): 21528-21532.
- Nam S Y, Lee H S, Jung G A, Choi J, Cho S J, Kim M K, Kim W H, Lee B L. Akt/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis. *APMIS* 2003; (111): 1105-1113.
- Nawrocki B, Polette M, Marchand V, Monteau M, Gillery P, Tournier J M, Birembaut P. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantitative and morphological analyses. *Int J Cancer* 1997; (72): 556-564.
- Nawrocki-Raby B, Polette M, Tournier J M, Birembaut P. Rôle des métalloprotéinases matricielles dans le remodelage de la matrice extracellulaire au cours des phénomènes de migration cellulaire de l'épithélium bronchique. *La lettre du Pneumologue* 2001; (IV): 161-166.
- Nechushtan A, Smith C L, Hsu Y T, Youle R J. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 1999; (18): 2330-2341.
- Nechushtan A, Smith C L, Lamensdorf I, Yoon S H, Youle R J. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* 2001; (153): 1265-1276.
- Nguyen M, Arkell J, Jackson C J. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; (33): 960-970.
- Nicholson D W, Thornberry N A. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; (22): 299-306.
- Nicholson K M, Anderson N G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal* 2002; (14): 381-395.
- Niederacher D, An H X, Cho Y J, Hantschmann P, Bender H G, Beckmann M W. Mutations and amplification of oncogenes in endometrial cancer. *Oncology* 1999; (56): 59-65.
- Nishida M. The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell* 2002; (15): 104-117.

- Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; (334): 661-665.
- Noda K, Ishida S, Inoue M, Obata K, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E. Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; (44): 2163-2170.
- Noël G, Genestie C, Votadoro A, Lefranc J. Chapitre 10: cancers de l'endomètre, partie II. Faculté de Médecine Pierre & Marie Curie . 2002.
- Nor J E, Christensen J, Mooney D J, Polverini P J. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 1999; (154): 375-384.
- Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M. Multiple roles of cyclooxygenase-2 in endometrial cancer. *Anticancer Res* 2005; (25): 3679-3687.
- Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules. *J Biol Chem* 1997; (272): 2446-2451.
- Okumura K, Mendoza M, Bachoo R M, DePinho R A, Cavenee W K, Furnari F B. PCAF modulates PTEN activity. *J Biol Chem* 2006; (281): 26562-26568.
- Olins G M, Bremel R D. Oxytocin-stimulated myosin phosphorylation in mammary myoepithelial cells: roles of calcium ions and cyclic nucleotides. *Endocrinology* 1984; (114): 1617-1626.
- Oliver F J, de la R G, Rolli V, Ruiz-Ruiz M C, de Murcia G, Murcia J M. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *J Biol Chem* 1998; (273): 33533-33539.
- Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; (74): 609-619.
- Oshima M, Dinchuk J E, Kargman S L, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos J M, Evans J F, Taketo M M. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996; (87): 803-809.

- Pacold M E, Suire S, Perisic O, Lara-Gonzalez S, Davis C T, Walker E H, Hawkins P T, Stephens L, Eccleston J F, Williams R L. Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* 2000; (103): 931-943.
- Palmer B F, Henrich W L. Clinical acute renal failure with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Semin Nephrol* 1995; (15): 214-227.
- Pap M, Cooper G M. Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 1998; (273): 19929-19932.
- Parent J, Villeneuve C, Fortier M A. Evaluation of the contribution of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 to the production of PGE2 and PGF2 alpha in epithelial cells from bovine endometrium. *Reproduction* 2003; (126): 539-547.
- Park B K, Zeng X, Glazer R I. Akt1 induces extracellular matrix invasion and matrix metalloproteinase-2 activity in mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2001; (61): 7647-7653.
- Park B, Vogelstein B. Tumor Suppressor Genes. In: *Cancer Medicine*. (Ed. BC Decker Inc). 2006; 7e: 85-103.
- Patterson M L, Atkinson S J, Knauper V, Murphy G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett* 2001; (503): 158-162.
- Pequeux C, Breton C, Hendrick J C, Hagelstein M T, Martens H, Winkler R, Geenen V, Legros J J. Oxytocin synthesis and oxytocin receptor expression by cell lines of human small cell carcinoma of the lung stimulate tumor growth through autocrine/paracrine signaling. *Cancer Res* 2002; (62): 4623-4629.
- Pequeux C, Keegan B P, Hagelstein M T, Geenen V, Legros J J, North W G. Oxytocin- and vasopressin-induced growth of human small-cell lung cancer is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocr Relat Cancer* 2004; (11): 871-885.
- Perez-Tenorio G, Stal O. Activation of AKT/PKB in breast cancer predicts a worse outcome among endocrine treated patients. *Br J Cancer* 2002; (86): 540-545.
- Philipose S, Konya V, Sreckovic I, Marsche G, Lippe I T, Peskar B A, Heinemann A, Schuligoi R. The prostaglandin E2 receptor EP4 is expressed by human platelets and potently inhibits platelet aggregation and thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; (30): 2416-2423.

- Pierotti M, Frattini M, Sozzi G, Croce C. Oncogenes. In: Cancer Medicine. (Ed.BC Decker Inc). 2006; 7e: 68-84.
- Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)* 2011; (3): 279-296.
- Plaxe S, Mundt A. Endometrial cancer: Staging, treatment, and follow-up. *Uptodate* . 2009a.
- Plaxe S, Mundt A. Treatment of locally recurrent or advanced endometrial cancer. *Uptodate* . 2009b.
- Podsypanina K, Lee R T, Politis C, Hennessy I, Crane A, Puc J, Neshat M, Wang H, Yang L, Gibbons J, Frost P, Dreisbach V, Blenis J, Gaciong Z, Fisher P, Sawyers C, Hedrick-Ellenson L, Parsons R. An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten+/- mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; (98): 10320-10325.
- Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembaut P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; (49): 179-186.
- Poligone B, Baldwin A S. Positive and negative regulation of NF-kappaB by COX-2: roles of different prostaglandins. *J Biol Chem* 2001; (276): 38658-38664.
- Pons S, Asano T, Glasheen E, Miralpeix M, Zhang Y, Fisher T L, Myers M G, Jr., Sun X J, White M F. The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 1995; (15): 4453-4465.
- Powis G, Bonjouklian R, Berggren M M, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter W F, Dodge J, Grindey G, . Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 1994; (54): 2419-2423.
- Poyser N L. The control of prostaglandin production by the endometrium in relation to luteolysis and menstruation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1995; (53): 147-195.
- Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich K A, Boxer L M, Heasley L E, Reusch J E. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 2000; (275): 10761-10766.
- Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K. Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by in situ hybridization. *Cancer Res* 1992; (52): 1336-1341.

- Radu A, Neubauer V, Akagi T, Hanafusa H, Georgescu M M. PTEN induces cell cycle arrest by decreasing the level and nuclear localization of cyclin D1. *Mol Cell Biol* 2003; (23): 6139-6149.
- Rahaman J, Cohen CJ. Endometrial Cancer. In: *Cancer Medicine*. (Ed.BC Decker Inc). 2006; 7e: 1522-1536.
- Ramaswamy S, Ross K N, Lander E S, Golub T R. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet* 2003; (33): 49-54.
- Remacle A, Murphy G, Roghi C. Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface. *J Cell Sci* 2003; (116): 3905-3916.
- Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat J P. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 1998; (34): 791-808.
- Richard S, Zingg H H. The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. *J Biol Chem* 1990; (265): 6098-6103.
- Richardson G S, Dickersin G R, Atkins L, MacLaughlin D T, Raam S, Merk L P, Bradley F M. KLE: a cell line with defective estrogen receptor derived from undifferentiated endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 1984; (17): 213-230.
- Richter B W, Mir S S, Eiben L J, Lewis J, Reffey S B, Frattini A, Tian L, Frank S, Youle R J, Nelson D L, Notarangelo L D, Vezzoni P, Fearnhead H O, Duckett C S. Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol Cell Biol* 2001; (21): 4292-4301.
- Riedl S J, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; (5): 897-907.
- Rimoldi V, Reversi A, Taverna E, Rosa P, Francolini M, Cassoni P, Parenti M, Chini B. Oxytocin receptor elicits different EGFR/MAPK activation patterns depending on its localization in caveolin-1 enriched domains. *Oncogene* 2003; (22): 6054-6060.
- Rios A, Vargas-Robles H, Gamez-Mendez A M, Escalante B. Cyclooxygenase-2 and kidney failure. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2011.
- Riou G, Barrois M, Sheng Z M, Duvillard P, Lhomme C. Somatic deletions and mutations of c-Ha-ras gene in human cervical cancers. *Oncogene* 1988; (3): 329-333.

Rishikesk M, Sadhana S. **PROSTAGLANDINS AND CYCLOOXYGENASE: THEIR PROBABLE ROLE IN**

**CANCER.** Indian Journal of Pharmacology 2003; (35): 3-12.

Risinger J I, Hayes A K, Berchuck A, Barrett J C. PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. Cancer Res 1997; (57): 4736-4738.

Risinger J F, Maxwell G F, Chandramouli G F, Jazaeri A F, Aprelikova O F, Patterson T F, Berchuck A F, Barrett J C. Microarray analysis reveals distinct gene expression profiles among different histologic types of endometrial cancer.

Rizo J, Sudhof T C. C2-domains, structure and function of a universal Ca<sup>2+</sup>-binding domain. J Biol Chem 1998; (273): 15879-15882.

Robertson R P. Dominance of cyclooxygenase-2 in the regulation of pancreatic islet prostaglandin synthesis. Diabetes 1998; (47): 1379-1383.

Rodenhuis S, Slebos R J. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. Cancer Res 1992; (52): 2665s-2669s.

Rodriguez D, Morrison C J, Overall C M. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. Biochim Biophys Acta 2010; (1803): 39-54.

Rodriguez-Viciano P, Warne P H, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry M J, Waterfield M D, Downward J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. Nature 1994; (370): 527-532.

Roepman P, Wessels L F, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles A J, Lijnzaad P, Tilanus M G, Koole R, Hordijk G J, van der Vliet P C, Reinders M J, Slootweg P J, Holstege F C. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. Nat Genet 2005; (37): 182-186.

Rolitsky C D, Theil K S, McGaughy V R, Copeland L J, Niemann T H. HER-2/neu amplification and overexpression in endometrial carcinoma. Int J Gynecol Pathol 1999; (18): 138-143.

Romashkova J A, Makarov S S. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. Nature 1999; (401): 86-90.

- Rothe M, Pan M G, Henzel W J, Ayres T M, Goeddel D V. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995; (83): 1243-1252.
- Rouette A, Parent S, Girouard J, Leblanc V, Asselin E. Cisplatin increases B-cell-lymphoma-2 expression via activation of protein kinase C and Akt2 in endometrial cancer cells. *Int J Cancer* 2012; (130): 1755-1767.
- Rowinsky E K. Targeted induction of apoptosis in cancer management: the emerging role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor activating agents. *J Clin Oncol* 2005; (23): 9394-9407.
- Roy H K, Olusola B F, Clemens D L, Karolski W J, Ratashak A, Lynch H T, Smyrk T C. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2002; (23): 201-205.
- Roy R, Yang J, Moses M A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 2009; (27): 5287-5297.
- Sabbieti M G, Agas D, Marchetti L, Santoni G, Amantini C, Xiao L, Menghi G, Hurley M M. Signaling pathways implicated in PGF2 $\alpha$  effects on Fgf2 $^{+/+}$  and Fgf2 $^{-/-}$  osteoblasts. *J Cell Physiol* 2010; (224): 465-474.
- Sabeh F, Li X Y, Saunders T L, Rowe R G, Weiss S J. Secreted versus membrane-anchored collagenases: relative roles in fibroblast-dependent collagenolysis and invasion. *J Biol Chem* 2009; (284): 23001-23011.
- Sales K J, Katz A A, Howard B, Soeters R P, Millar R P, Jabbour H N. Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1. *Cancer Res* 2002; (62): 424-432.
- Samuel T, Okada K, Hyer M, Welsh K, Zapata J M, Reed J C. cIAP1 Localizes to the nuclear compartment and modulates the cell cycle. *Cancer Res* 2005; (65): 210-218.
- Sarbassov D D, Guertin D A, Ali S M, Sabatini D M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; (307): 1098-1101.
- Sasaki H, Nishii H, Takahashi H, Tada A, Furusato M, Terashima Y, Siegal G P, Parker S L, Kohler M F, Berchuck A, . Mutation of the Ki-ras protooncogene in human endometrial hyperplasia and carcinoma. *Cancer Res* 1993; (53): 1906-1910.

- Schafer A I. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharmacol* 1995; (35): 209-219.
- Schechter A L, Hung M C, Vaidyanathan L, Weinberg R A, Yang-Feng T L, Francke U, Ullrich A, Coussens L. The neu gene: an erbB-homologous gene distinct from and unlinked to the gene encoding the EGF receptor. *Science* 1985; (229): 976-978.
- Schile A J, Garcia-Fernandez M, Steller H. Regulation of apoptosis by XIAP ubiquitin-ligase activity. *Genes Dev* 2008; (22): 2256-2266.
- Schlieman M G, Fahy B N, Ramsamooj R, Beckett L, Bold R J. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer* 2003; (89): 2110-2115.
- Schöni-Affolter F. Rôle et anatomie fonctionnels de l'endomètre. Université de Fribourg, Université de Lausanne, and Université de Berne. Cours d'embryologie en ligne . 1999. Campus Virtuel Suisse.
- Schu P V, Takegawa K, Fry M J, Stack J H, Waterfield M D, Emr S D. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* 1993; (260): 88-91.
- Scott F L, Denault J B, Riedl S J, Shin H, Renatus M, Salvesen G S. XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs. *EMBO J* 2005; (24): 645-655.
- Segal R A, Greenberg M E. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 1996; (19): 463-489.
- Shankar E, Krishnamurthy S, Paranandi R, Basu A. PKCepsilon induces Bcl-2 by activating CREB. *Int J Oncol* 2010; (36): 883-888.
- Sharma S, Stolina M, Yang S C, Baratelli F, Lin J F, Atianzar K, Luo J, Zhu L, Lin Y, Huang M, Dohadwala M, Batra R K, Dubinett S M. Tumor cyclooxygenase 2-dependent suppression of dendritic cell function. *Clin Cancer Res* 2003; (9): 961-968.
- Shaw L M, Rabinovitz I, Wang H H, Toker A, Mercurio A M. Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 1997; (91): 949-960.
- Shen W H, Balajee A S, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi P P, Yin Y. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell* 2007; (128): 157-170.



- Sherman M E. Theories of endometrial carcinogenesis: a multidisciplinary approach. *Mod Pathol* 2000; (13): 295-308.
- Sherman M E, Bur M E, Kurman R J. p53 in endometrial cancer and its putative precursors: evidence for diverse pathways of tumorigenesis. *Hum Pathol* 1995; (26): 1268-1274.
- Shih C, Padhy L C, Murray M, Weinberg R A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* 1981; (290): 261-264.
- Shiota C, Woo J T, Lindner J, Shelton K D, Magnuson M A. Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev Cell* 2006; (11): 583-589.
- Sier C F, Casetta G, Verheijen J H, Tizzani A, Agape V, Kos J, Blasi F, Hanemaaijer R. Enhanced urinary gelatinase activities (matrix metalloproteinases 2 and 9) are associated with early-stage bladder carcinoma: a comparison with clinically used tumor markers. *Clin Cancer Res* 2000; (6): 2333-2340.
- Silke J, Kratina T, Chu D, Ekert P G, Day C L, Pakusch M, Huang D C, Vaux D L. Determination of cell survival by RING-mediated regulation of inhibitor of apoptosis (IAP) protein abundance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; (102): 16182-16187.
- Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001; (264): 29-41.
- Sizemore N, Leung S, Stark G R. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol* 1999; (19): 4798-4805.
- Sjolander A, Yamamoto K, Huber B E, Lapetina E G. Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; (88): 7908-7912.
- Slamon D J, Godolphin W, Jones L A, Holt J A, Wong S G, Keith D E, Levin W J, Stuart S G, Udove J, Ullrich A, . Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989; (244): 707-712.
- Slater D M, Zervou S, Thornton S. Prostaglandins and prostanoid receptors in human pregnancy and parturition. *J Soc Gynecol Investig* 2002; (9): 118-124.

- Slee E A, Harte M T, Kluck R M, Wolf B B, Casiano C A, Newmeyer D D, Wang H G, Reed J C, Nicholson D W, Alnemri E S, Green D R, Martin S J. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; (144): 281-292.
- Slomovitz B M, Burke T W, Eifel P J, Ramondetta L M, Silva E G, Jhingran A, Oh J C, Atkinson E N, Broaddus R R, Gershenson D M, Lu K H. Uterine papillary serous carcinoma (UPSC): a single institution review of 129 cases. *Gynecol Oncol* 2003; (91): 463-469.
- Smith W L, DeWitt D L, Garavito R M. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; (69): 145-182.
- Smith W L, Garavito R M, DeWitt D L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996; (271): 33157-33160.
- Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int J Cell Biol* 2010; (2010): 215158.
- Société Canadienne du Cancer. Statistiques canadiennes sur le cancer (2009). 2010.
- Société Canadienne du Cancer. Signes et symptômes du cancer de l'utérus. Encyclopédie Canadienne du cancer 2009 . 2011.
- Société Canadienne du Cancer, Institut National du Cancer du Canada, Statistique Canada, Agence de Santé Publique Canada. Statistiques Canadienne sur le Cancer 2012. Statistiques Canadienne sur le Cancer 2012 , 1-77. 2012.
- Soini Y, Alarakkola E, Autio-Harmainen H. Expression of messenger RNAs for metalloproteinases 2 and 9, type IV collagen, and laminin in nonneoplastic and neoplastic endometrium. *Hum Pathol* 1997; (28): 220-226.
- Somiari S B, Somiari R I, Heckman C M, Olsen C H, Jordan R M, Russell S J, Shriver C D. Circulating MMP2 and MMP9 in breast cancer -- potential role in classification of patients into low risk, high risk, benign disease and breast cancer categories. *Int J Cancer* 2006; (119): 1403-1411.
- Sorenson C M, Barry M A, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst* 1990; (82): 749-755.

- Springer J E, Azbill R D, Nottingham S A, Kennedy S E. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 2000; (20): 7246-7251.
- Srinivasula S M, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Lee R A, Robbins P D, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri E S. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001; (410): 112-116.
- St Germain M E, Gagnon V, Mathieu I, Parent S, Asselin E. Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int J Oncol* 2004a; (24): 1311-1324.
- St Germain M E, Gagnon V, Parent S, Asselin E. Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway. *Mol Cancer* 2004b; (3:7.): 7.
- Staal S P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; (84): 5034-5037.
- Staal S P, Huebner K, Croce C M, Parsa N Z, Testa J R. The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics* 1988; (2): 96-98.
- Stambolic V, Tsao M S, Macpherson D, Suzuki A, Chapman W B, Mak T W. High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten+/- mice. *Cancer Res* 2000; (60): 3605-3611.
- Steck P A, Pershouse M A, Jasser S A, Yung W K, Lin H, Ligon A H, Langford L A, Baumgard M L, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng D H, Tavtigian S V. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; (15): 356-362.
- Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid J A, Binder B R, Lipp J. Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *J Exp Med* 1998; (188): 211-216.
- Stennicke H R, Salvesen G S. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta* 1998; (1387): 17-31.

- Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter G F, Holmes A B, Gaffney P R, Reese C B, McCormick F, Tempst P, Coadwell J, Hawkins P T. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 1998; (279): 710-714.
- Stephens L R, Hughes K T, Irvine R F. Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature* 1991; (351): 33-39.
- Stokoe D, Stephens L R, Copeland T, Gaffney P R, Reese C B, Painter G F, Holmes A B, McCormick F, Hawkins P T. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* 1997; (277): 567-570.
- Strakova Z, Copland J A, Lolait S J, Soloff M S. ERK2 mediates oxytocin-stimulated PGE2 synthesis. *Am J Physiol* 1998; (274): E634-E641.
- Strickland D K, Ashcom J D, Williams S, Burgess W H, Migliorini M, Argraves W S. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem* 1990; (265): 17401-17404.
- Sugimoto Y, Whitman M, Cantley L C, Erikson R L. Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; (81): 2117-2121.
- Sun C, Cai M, Meadows R P, Xu N, Gunasekera A H, Herrmann J, Wu J C, Fesik S W. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. *J Biol Chem* 2000; (275): 33777-33781.
- Surucu B, Bozulic L, Hynx D, Parcellier A, Hemmings B A. In vivo analysis of protein kinase B (PKB)/Akt regulation in DNA-PKcs-null mice reveals a role for PKB/Akt in DNA damage response and tumorigenesis. *J Biol Chem* 2008; (283): 30025-30033.
- Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* 2001; (8): 613-621.
- Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen G S, Reed J C. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 1998; (273): 7787-7790.

- Takemura M, Azuma C, Kimura T, Tokugawa Y, Miki M, Ono M, Saji F, Tanizawa O. Malignant cell-specific gelatinase activity in human endometrial carcinoma. *Cancer* 1992; (70): 147-151.
- Takemura M, Kimura T, Nomura S, Makino Y, Inoue T, Kikuchi T, Kubota Y, Tokugawa Y, Nobunaga T, Kamiura S, . Expression and localization of human oxytocin receptor mRNA and its protein in chorion and decidua during parturition. *J Clin Invest* 1994; (93): 2319-2323.
- Takemura M, Nomura S, Kimura T, Inoue T, Onoue H, Azuma C, Saji F, Kitamura Y, Tanizawa O. Expression and localization of oxytocin receptor gene in human uterine endometrium in relation to the menstrual cycle. *Endocrinology* 1993; (132): 1830-1835.
- Takeuchi K, Kato S, Amagase K. Prostaglandin EP receptors involved in modulating gastrointestinal mucosal integrity. *J Pharmacol Sci* 2010; (114): 248-261.
- Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada K M. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998; (280): 1614-1617.
- Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; (68-69): 95-114.
- Tanno S, Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare D A, Xiao G H, Testa J R. AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2001; (61): 589-593.
- Tashiro H, Blazes M S, Wu R, Cho K R, Bose S, Wang S I, Li J, Parsons R, Ellenson L H. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res* 1997; (57): 3935-3940.
- Terakawa N, Kanamori Y, Yoshida S. Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 2003; (10): 203-208.
- Thibonnier M, Conarty D M, Preston J A, Plesnicher C L, Dweik R A, Erzurum S C. Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. *Endocrinology* 1999; (140): 1301-1309.
- Thigpen J T, Blessing J A, Homesley H, Creasman W T, Sutton G. Phase II trial of cisplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol* 1989; (33): 68-70.

- Thigpen J T, Brady M F, Homesley H D, Malfetano J, DuBeshter B, Burger R A, Liao S. Phase III trial of doxorubicin with or without cisplatin in advanced endometrial carcinoma: a gynecologic oncology group study. *J Clin Oncol* 2004; (22): 3902-3908.
- Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; (267): 1456-1462.
- Tian M, Cui Y Z, Song G H, Zong M J, Zhou X Y, Chen Y, Han J X. Proteomic analysis identifies MMP-9, DJ-1 and A1BG as overexpressed proteins in pancreatic juice from pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *BMC Cancer* 2008; (8): 241.
- Tithof P K, Roberts M P, Guan W, Elgayyar M, Godkin J D. Distinct phospholipase A2 enzymes regulate prostaglandin E2 and F2alpha production by bovine endometrial epithelial cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2007; (5): 16.
- Toker A, Newton A C. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *J Biol Chem* 2000; (275): 8271-8274.
- Torres J, Pulido R. The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem* 2001; (276): 993-998.
- Torres J, Rodriguez J, Myers M P, Valiente M, Graves J D, Tonks N K, Pulido R. Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem* 2003; (278): 30652-30660.
- Tortora G, Grabowski S. The Reproductive System. In: Tortora, Grabowski: Principles of Anatomy and Physiology, 9th Edition. (Ed.ERPI). 2001; 9e.
- Trevethick M A, Oakley I, Clayton N M, Strong P. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced gastric damage in experimental animals: underlying pathological mechanisms. *Gen Pharmacol* 1995; (26): 1455-1459.
- Tsai C M, Chang K T, Wu L H, Chen J Y, Gazdar A F, Mitsudomi T, Chen M H, Perng R P. Correlations between intrinsic chemoresistance and HER-2/neu gene expression, p53 gene mutations, and cell proliferation characteristics in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1996; (56): 206-209.
- Tsuji M, Dubois R N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995; (83): 493-501.

- Tsuji M, Kawano S, Dubois R N. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; (94): 3336-3340.
- Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 1998; (3): 697-707.
- Tu S P, Sun Y W, Cui J T, Zou B, Lin M C, Gu Q, Jiang S H, Kung H F, Korneluk R G, Wong B C. Tumor suppressor XIAP-Associated factor 1 (XAF1) cooperates with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand to suppress colon cancer growth and trigger tumor regression. *Cancer* 2010; (116): 1252-1263.
- Tzahar E, Waterman H, Chen X, Levkowitz G, Karunagaran D, Lavi S, Ratzkin B J, Yarden Y. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996; (16): 5276-5287.
- Ueki K, Algenstaedt P, Mauvais-Jarvis F, Kahn C R. Positive and negative regulation of phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathways by three different gene products of the p85alpha regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 2000; (20): 8035-8046.
- Urban T, Ricci S, Grange J D, Lacave R, Boudghene F, Breitmayer F, Languille O, Roland J, Bernaudin J F. Detection of c-Ki-ras mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1993; (85): 2008-2012.
- Van Themsche C, Lafontaine L, Asselin E. X-linked inhibitor of apoptosis protein levels and protein kinase C activity regulate the sensitivity of human endometrial carcinoma cells to tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Endocrinology* 2008; (149): 3789-3798.
- Van Themsche C, Leblanc V, Parent S, Asselin E. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) regulates PTEN ubiquitination, content, and compartmentalization. *J Biol Chem* 2009; (284): 20462-20466.
- Van Themsche C, Mathieu I, Parent S, Asselin E. Transforming growth factor-beta3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis and protein kinase c-dependent induction of matrix metalloproteinase-9. *J Biol Chem* 2007; (282): 4794-4802.

- Van Wart H E, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; (87): 5578-5582.
- van Wijk F H, Lhomme C, Bolis G, Scotto d P, V, Tumolo S, Nooij M, de Oliveira C F, Vermorken J B. Phase II study of carboplatin in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma. A trial of the EORTC Gynaecological Cancer Group. *Eur J Cancer* 2003; (39): 78-85.
- Vanhaesebroeck B, Alessi D R. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* 2000; (346 Pt 3): 561-576.
- Vanhaesebroeck B, Waterfield M D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999b; (253): 239-254.
- Vanhaesebroeck B, Waterfield M D. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* 1999a; (253): 239-254.
- Vatier C A, Mainardi C L, Harris E D, Jr. Inhibitor of human collagenase from cultures of human tendon. *J Biol Chem* 1979; (254): 3045-3053.
- Vaux D L. CED-4--the third horseman of apoptosis. *Cell* 1997; (90): 389-390.
- Vaux D L, Silke J. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; (6): 287-297.
- Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers W R. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 2000; (20): 5010-5018.
- Vegeto E, Shahbaz M M, Wen D X, Goldman M E, O'Malley B W, McDonnell D P. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993; (7): 1244-1255.
- Veillette A, Grenier K, Brasseur K, Fréchette-Frigon G, Lablanc V, Asselin E. Regulation of the PI 3-K/Akt survival pathway in the rat endometrium. *Biol Reprod.* 2013 March 28;88(3):79
- Verhagen A M, Ekert P G, Pakusch M, Silke J, Connolly L M, Reid G E, Moritz R L, Simpson R J, Vaux D L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000; (102): 43-53.



- Verhagen A M, Silke J, Ekert P G, Pakusch M, Kaufmann H, Connolly L M, Day C L, Tikoo A, Burke R, Wrobel C, Moritz R L, Simpson R J, Vaux D L. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 2002; (277): 445-454.
- Villa P, Kaufmann S H, Earnshaw W C. Caspases and caspase inhibitors. *Trends Biochem Sci* 1997; (22): 388-393.
- Villar J, Quadri H S, Song I, Tomita Y, Tirado O M, Notario V. PCPH/ENTPD5 expression confers to prostate cancer cells resistance against cisplatin-induced apoptosis through protein kinase Calpha-mediated Bcl-2 stabilization. *Cancer Res* 2009; (69): 102-110.
- Vivanco I, Sawyers C L. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; (2): 489-501.
- Vlahos C J, Matter W F, Hui K Y, Brown R F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 1994; (269): 5241-5248.
- von Euler U S. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J Physiol* 1936; (88): 213-234.
- Waite K A, Eng C. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet* 2002; (70): 829-844.
- Walker S M, Leslie N R, Perera N M, Batty I H, Downes C P. The tumour-suppressor function of PTEN requires an N-terminal lipid-binding motif. *Biochem J* 2004; (379): 301-307.
- Wan X, Li J, Xie X, Lu W. PTEN augments doxorubicin-induced apoptosis in PTEN-null Ishikawa cells. *Int J Gynecol Cancer* 2007; (17): 808-812.
- Wang H G, Pathan N, Ethell I M, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke T F, Reed J C. Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 1999; (284): 339-343.
- Wang J, Chun H J, Wong W, Spencer D M, Lenardo M J. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; (98): 13884-13888.

- Wang X, Baek S J, Eling T. COX inhibitors directly alter gene expression: role in cancer prevention? *Cancer Metastasis Rev* 2011.
- Wang X, Ma D, Keski-Oja J, Pei D. Co-recycling of MT1-MMP and MT3-MMP through the trans-Golgi network. Identification of DKV582 as a recycling signal. *J Biol Chem* 2004; (279): 9331-9336.
- Wang X, Shi Y, Wang J, Huang G, Jiang X. Crucial role of the C-terminus of PTEN in antagonizing NEDD4-1-mediated PTEN ubiquitination and degradation. *Biochem J* 2008; (414): 221-229.
- Wang X, Trotman L C, Koppie T, Alimonti A, Chen Z, Gao Z, Wang J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Cordon-Cardo C, Pandolfi P P, Jiang X. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell* 2007; (128): 129-139.
- Wang Y, Klijn J G, Zhang Y, Sieuwerts A M, Look M P, Yang F, Talantov D, Timmermans M, Meijer-van Gelder M E, Yu J, Jatkoe T, Berns E M, Atkins D, Foekens J A. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005; (365): 671-679.
- Way D L, Grosso D S, Davis J R, Surwit E A, Christian C D. Characterization of a new human endometrial carcinoma (RL95-2) established in tissue culture. *In Vitro* 1983; (19): 147-158.
- Wei W, Jin J, Schlisio S, Harper J W, Kaelin W G, Jr. The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell* 2005; (8): 25-33.
- Wei Y, Fan T, Yu M. Inhibitor of apoptosis proteins and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008; (40): 278-288.
- Weigelt B, Peterse J L, 't Veer L J. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* 2005; (5): 591-602.
- Weiner D B, Liu J, Cohen J A, Williams W V, Greene M I. A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 1989; (339): 230-231.
- Welcker M, Singer J, Loeb K R, Grim J, Bloecher A, Gurien-West M, Clurman B E, Roberts J M. Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell* 2003; (12): 381-392.

- White M F. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog Horm Res* 1998; (53): 119-138.
- Whitman M, Kaplan D R, Schaffhausen B, Cantley L, Roberts T M. Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature* 1985; (315): 239-242.
- Williamson R A, Marston F A, Angal S, Koklitis P, Panico M, Morris H R, Carne A F, Smith B J, Harris T J, Freedman R B. Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem J* 1990; (268): 267-274.
- Willman C, Hromas R. Genomic Alterations and Chromosomal Aberrations in Human Cancer. In: *Cancer Medicine*. (Ed. BC Decker Inc). 2006; 7e: 104-134.
- Wilson C A, Cajulis E E, Green J L, Olsen T M, Chung Y A, Damore M A, Dering J, Calzone F J, Slamon D J. HER-2 overexpression differentially alters transforming growth factor-beta responses in luminal versus mesenchymal human breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2005; (7): R1058-R1079.
- Woessner J F, Jr. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J* 1991; (5): 2145-2154.
- Wolf B B, Green D R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 1999; (274): 20049-20052.
- Wood M, Fudge K, Mohler J L, Frost A R, Garcia F, Wang M, Stearns M E. In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* 1997; (15): 246-258.
- Woodhouse E C, Chuaqui R F, Liotta L A. General mechanisms of metastasis. *Cancer* 1997; (80): 1529-1537.
- Wu C Y, Wang K, McDyer J F, Seder R A. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J Immunol* 1998; (161): 2723-2730.
- Wu X, Li J, Zhu M, Fletcher J A, Hodi F S. Protein Kinase C Inhibitor AEB071 Targets Ocular Melanoma Harboring GNAQ Mutations via Effects on the PKC/Erk1/2 and PKC/NF-kappaB Pathways. *Mol Cancer Ther* 2012.
- Wymann M P, Pirola L. Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim Biophys Acta* 1998; (1436): 127-150.

- Xiao C W, Ash K, Tsang B K. Nuclear factor-kappaB-mediated X-linked inhibitor of apoptosis protein expression prevents rat granulosa cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. *Endocrinology* 2001; (142): 557-563.
- Xu X, Sakon M, Nagano H, Hiraoka N, Yamamoto H, Hayashi N, Dono K, Nakamori S, Umeshita K, Ito Y, Matsuura N, Monden M. Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2004; (11): 25-32.
- Xu Z, Lu G, Wu F. Simvastatin suppresses homocysteine-induced apoptosis in endothelial cells: roles of caspase-3, cIAP-1 and cIAP-2. *Hypertens Res* 2009; (32): 375-380.
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise L H, Thompson C B, Korsmeyer S J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 1995; (80): 285-291.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim C N, Ibrado A M, Cai J, Peng T I, Jones D P, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; (275): 1129-1132.
- Yang S, Thiel K W, Leslie K K. Progesterone: the ultimate endometrial tumor suppressor. *Trends Endocrinol Metab* 2011; (22): 145-152.
- Yang Y, Fang S, Jensen J P, Weissman A M, Ashwell J D. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 2000; (288): 874-877.
- Yang Z Z, Tschopp O, Hemmings-Mieszczak M, Feng J, Brodbeck D, Perentes E, Hemmings B A. Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. *J Biol Chem* 2003; (278): 32124-32131.
- Yarden Y, Sliwkowski M X. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; (2): 127-137.
- Yeh E, Cunningham M, Arnold H, Chasse D, Monteith T, Ivaldi G, Hahn W C, Stukenberg P T, Shenolikar S, Uchida T, Counter C M, Nevins J R, Means A R, Sears R. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* 2004; (6): 308-318.
- Yokoyama M, Ochi K, Ichimura M, Mizushima T, Shinji T, Koide N, Tsurumi T, Hasuoka H, Harada M. Matrix metalloproteinase-2 in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer. *Pancreas* 2002; (24): 344-347.

- Youle R J, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; (9): 47-59.
- Yu J, Zhang Y, McIlroy J, Rordorf-Nikolic T, Orr G A, Backer J M. Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 1998; (18): 1379-1387.
- Yu X, Rajala R V, McGinnis J F, Li F, Anderson R E, Yan X, Li S, Elias R V, Knapp R R, Zhou X, Cao W. Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. *J Biol Chem* 2004; (279): 13086-13094.
- Yu X F, Han Z C. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Histol Histopathol* 2006; (21): 519-531.
- Zambraski E J. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function: experimental studies in animals. *Semin Nephrol* 1995; (15): 205-213.
- Zhang J, Anastasiadis P Z, Liu Y, Thompson E A, Fields A P. Protein kinase C (PKC) betaII induces cell invasion through a Ras/Mek-, PKC iota/Rac 1-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* 2004; (279): 22118-22123.
- Zhang W, Ding W, Chen Y, Feng M, Ouyang Y, Yu Y, He Z. Up-regulation of breast cancer resistance protein plays a role in HER2-mediated chemoresistance through PI3K/Akt and nuclear factor-kappa B signaling pathways in MCF7 breast cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2011; (43): 647-653.
- Zhou B P, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung M C. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2001; (3): 973-982.
- Zhu L, Ling S, Yu X D, Venkatesh L K, Subramanian T, Chinnadurai G, Kuo T H. Modulation of mitochondrial Ca(2+) homeostasis by Bcl-2. *J Biol Chem* 1999; (274): 33267-33273.
- Zhu W, Cowie A, Wasfy G W, Penn L Z, Leber B, Andrews D W. Bcl-2 mutants with restricted subcellular location reveal spatially distinct pathways for apoptosis in different cell types. *EMBO J* 1996; (15): 4130-4141.
- Zimmermann K C, Bonzon C, Green D R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; (92): 57-70.

Zou B, Chim C S, Zeng H, Leung S Y, Yang Y, Tu S P, Lin M C, Wang J, He H, Jiang S H, Sun Y W, Yu L F, Yuen S T, Kung H F, Wong B C. Correlation between the single-site CpG methylation and expression silencing of the XAF1 gene in human gastric and colon cancers. *Gastroenterology* 2006; (131): 1835-1843.

Zvelebil M J, MacDougall L, Leervers S, Volinia S, Vanhaesebroeck B, Gout I, Panayotou G, Domin J, Stein R, Pages F, . Structural and functional diversity of phosphoinositide 3-kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1996; (351): 217-223.